

HAZİRAN 2019

Yüksek Lisans Tezi-Biyoloji

ASIYE GÖZÜBÜYÜK

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GAZİANTEP'TEKİ *Morus alba* L. (Ak Dut), *Paulownia tomentosa*
L. (Prens Ağacı) ve *Quercus robur* L. (Saplı Meşe)
POLENLERİNİN MORFOLOJİSİ ve ALERJİK PROTEİN
KONSANTRASYONLARININ BELİRLENMESİ

BİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ASIYE GÖZÜBÜYÜK
HAZİRAN 2019

**GAZİANTEP'TEKİ *Morus alba* L., *Paulownia tomentosa* L. ve *Quercus robur* L.
POLENLERİNİN MORFOLOJİSİ ve ALERJİK PROTEİN
KONSANTRASYONLARININ BELİRLENMESİ**

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji

Yüksek Lisans Tezi



Danışman

Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ

Asiye GÖZÜBÜYÜK

Haziran 2019



©2019[Asiye GÖZÜBÜYÜK]

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ

Tezin Başlığı : Gaziantep'deki *Morus alba* L., *Paulownia tomentosa* L. ve *Quercus robur* L.
Polenlerinin Morfolojisi ve Alerjik Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Öğrencinin Adı Soyadı: Asiye GÖZÜBÜYÜK

Sınav Tarihi : 19.06.2019

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. A. Necmeddin YAZICI
Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylıyorum.

Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER
Enstitü Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ
Danışman

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

İmzası

Prof. Dr. Sevda KIRBAĞ

.....

Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

.....

Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ

.....

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilmek suretiyle tezde yer aldığını beyan ederim.

Asiye GÖZÜBÜYÜK

ABSTRACT

DETERMINATION OF ALLERGIC PROTEIN CONCENTRATIONS IN POLLEN and POLLEN MORPHOLOGY of *Morus alba* L., *Paulownia tomentosa* L. and *Quercus robur* L. in GAZIANTEP

GÖZÜBÜYÜK, Asiye

M.Sc. in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Işık Didem KARAGÖZ

June 2019

50 pages

Antigens and their derivatives, which trigger the immune system and cause allergic reactions, are called allergens. Many volatile allergens are water-soluble proteins or glycoproteins, usually between 15 and 50 kDa. To date, allergen proteins from many different sources have been purified and identified. Almost anything that has a protein structure can show allergenic properties and every allergen source can contain a large number of allergic structures. Within the scope of this study, the concentrations of protein which may be allergenic to the pollen of *Morus alba* L., *Quercus robur* L. and *Paulownia tomentosa* widely used for landscaping in Gaziantep province were investigated. Pollen samples were collected and extracted during dissemination periods (April to May). Concentrations of extracted pollen proteins were determined and compared to protein concentrations of standard allergen kits ready for use in clinical practice. The results were recorded for evaluation. BCA Protein Assay Kit was used to determine pollen protein concentrations. In the study carried out in accordance with the protocol of the kit, the solutions prepared by diluting pollen specimens were measured with a 562 nm wavelength spectrophotometer (Thermo Multiskan Go) and concentrations ($\mu\text{g} / \text{ml}$) were determined by the equation. The panel was purged of a basis for work to be done to expand the panel.

Keywords: Allergen, Pollen, *Morus alba* L., *Quercus robur* L., *Paulownia tomentosa* L.

ÖZET

GAZİANTEP'TEKİ *Morus alba* L., *Paulownia tomentosa* L. ve *Quercus robur* L. POLEN MORFOLOJİSİ ve POLENLERDEKİ ALERJİK PROTEİN KONSANTRASYONLARININ BELİRLENMESİ

GÖZÜBÜYÜK, Asiye

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji

Danışman: Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ

Haziran 2019

50 sayfa

İmmün sistemi tetikleyen ve alerjik reaksiyonların oluşmasına neden olan antijen ve türevleri, alerjen olarak isimlendirilir. Birçok uçucu alerjenler genellikle 15-50kDa arasında bulunan ve suda çözünebilen proteinler veya glikoproteinlerdir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda birçok farklı kaynaktan alerjen proteinleri saflaştırılmış ve tanımlanmıştır. Protein yapısına sahip olan hemen her şey alerjen özelliği gösterebilir ve her alerjen kaynağı çok fazla sayıda alerjik yapı içerebilir. Bu çalışma kapsamında Gaziantep ilinde yaygın olarak peyzaj amaçlı kullanılan Ak Dut (*Morus alba* L.), Saplı Meşe (*Quercus robur* L.) ve Prenses Ağacı (*Paulownia tomentosa* L.) Polenlerinin alerjenik olabilecek protein konsantrasyonları araştırılmıştır. Polen örnekleri disseminasyon dönemlerinde (Nisan-Mayıs ayları) toplanmıştır ve ekstre edilmiştir. Ekstre edilen polen proteinlerinin konsantrasyonları belirlenmiş ve klinik uygulamalarda hazır olarak kullanılan standart alerjen kitlerin protein konsantrasyonları ile kıyaslanmıştır. Sonuçlar değerlendirilmek üzere kaydedilmiştir. Polen protein konsantrasyonlarının belirlenmesinde BCA Protein Assay Kit kullanılmıştır. Kit içeriğindeki protokol doğrultusunda yapılan çalışmada polen örneklerinin belirli oranda dilüe edilerek hazırlanan solüsyonları 562 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazı (Thermo Multiskan Go) ile ölçülmüş ve konsantrasyonlar ($\mu\text{g/ml}$) belirlenmiştir. Böylece alerji panellerinin genişletilmesi için yürütülecek çalışmalara bir temel oluşturulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Alerji, Polen, Ak Dut, Saplı Meşe, Prenses Ağacı

*Geride kalan ömrümü henüz paylaşmaya başladığım çok
kıymetli eşime, yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen
çok değerli aileme...*

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince tüm bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen ve tezimde büyük emeği olan, Gaziantep Üniversitesi öğretim üyelerinden danışman hocam, sayın Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ'e sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Engin bilgi ve tecrübeleriyle bizleri eğitimimiz boyunca destekleyen sayın Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ' a

Çalışmalarımızda bitki teşhisinde yardımlarını esirgemeyen sayın Dr. Hüseyin TEKİN'e

Örneklerin toplanmasında, preparasyonunda ve teşhislerinde desteklerini benden esirgemeyen değerli arkadaşlarım Yüksek Biyolog Hiba HÜSSEİN 'e ve Yüksek Biyolog Başak SİMİTÇİOĞLU' na Biyolog Hatice Bakiye GÜCEĞLİOĞLU' na çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ABSTRACT	vi
ÖZET	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar LİSTESİ	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
1.2 GENEL BİLGİLER.....	2
1.2.1 ALERJİ	2
1.2.2 Alerji Mekanizması	4
1.3 Alerjiyi Tetikleyen Çevresel Etmenler	6
1.3.1 Alerjenler	6
1.3.2 Enfeksiyonlar	6
1.3.3 Sigara	6
1.3.4 Hava Kirliliği	7
1.3.5 Diyet	7
1.4 Alerji Hastalarında Klinik Bulgular	7
1.5 Klinik ve Laboratuvar Destekli Alerji Tanısı	8
1.5.1 Alerjen Deri Testi (Skin Prick Test).....	8
1.6 ALERJENLER	9
1.6.1 Polen Alerjenleri.....	10
1.7 Bitki Sistematiikleri ve Genel Bilgiler	12
1.7.1 <i>Morus alba</i> L. (Akdut) Taksonomi	12
1.7.2 <i>Quercus robur</i> L. (Saplı meşe).....	15
1.7.3 <i>Paulownia tomentosa</i> (Prensese Ağacı)	18
1.8 Alerjenik Protein Tanımlanmasında Kullanılan Stratejiler	20

BÖLÜM 2	22
LİTERATÜR ÖZETİ	22
BÖLÜM 3	25
MATERYAL METOD	25
3.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	25
3.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	25
3.3 Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar	26
3.4 Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler.....	26
3.5 Polenlerin Toplanması ve Çalışmaya Uygun Hale Getirme	27
3.6 Gliserinli Jelatin Hazırlama	27
3.7 Polen Morfolojisinin İncelenmesi	28
3.7.1 Polen Ölçümleri.....	28
3.8 Polen Ekstrelerinin Hazırlanması.....	28
3.8.1 Polen Ekstrelerinin Hazırlanmasında İzlenen Yol	28
3.8.2 Ekstraksiyon İçin Gereken Maddeler	29
BÖLÜM 4	31
BULGULAR	31
4.1 Polen Morfolojileri ve Ölçümler	31
4.2 Protein Konsantrasyonları.....	35
BÖLÜM 5	37
TARTIŞMA	37
KAYNAKLAR	41

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1 <i>Morus nigra</i> L.ve <i>Quercus robur</i> L Tanımlanan Bazı Alerjen Proteinler	11
Tablo 4.1 Polen ölçüm sonuçları	32
Tablo 4.2 Polen Konsantrasyon Ölçüm Sonuçları	36



ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Alerjik Reaksiyonların Erken ve Geç Fazı.....	3
Şekil 1.2 Hücre Reseptörü	5
Şekil 1.3 Çeşitli Polen Tiplerinin Elektron Mikroskobu Görüntüsü	11
Şekil 1.4 <i>Morus alba</i> L. genel yaprak, dal, meyve görüntüsü	13
Şekil 1.5 <i>Morus alba</i> L. genel yaprak, dal, meyve görüntüsü	13
Şekil 1.6 <i>Morus alba</i> L. Çiçek ve Yeni Oluşan Yaprakları ve Meyvesi	14
Şekil 1.7 <i>Morus alba</i> L. Polen Görüntüsü X40.....	14
Şekil 1.8 <i>Quercus robur</i> L. genel yaprak, dal, meyve görünümü	16
Şekil 1.9 <i>Quercus robur</i> L. Yaprak ve Palamut Görünümü	16
Şekil 1.10 <i>Quercus robur</i> L. Polen Morfolojisi X40.....	17
Şekil 1.11 <i>Quercus robur</i> L. Polen Morfolojisi X40.....	17
Şekil 1.12 <i>Paulownia tomentosa</i> L. Genel Görünümü	19
Şekil 1.13 <i>Paulownia tomentosa</i> L. Polen Morfolojisi X40	19
Şekil 4.1 <i>Morus alba</i> L. Polen Ekzin Ölçümleri X40	31
Şekil 4.2 <i>Paulownia tomentosa</i> L. Polen Ekzin Ölçümleri X40	32
Şekil 4.3 <i>Paulownia tomentosa</i> L. Polen Ekzin Ölçümleri X40	33
Şekil 4.4 <i>Quercus robur</i> L. Polen Ekzin Ölçümleri X40.....	33
Şekil 4.5 <i>Quercus robur</i> L. Polen Ekzin Ölçümleri X40.....	34
Şekil 4.6 Protein konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan standart grafik	35

KISALTMALAR LİSTESİ

kDa	Kilodalton
M	Molar
Rpm	Dakika Başına Devir Sayısı
IgE	İmmünglobulin E
IgM	İmmünglobulin M
IgG	İmmünglobulin G
SEM	Scaning Electron Microscope (Taramalı E.M.)
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
ekt	Ektekzin
end	Endekzin
BCA	Bişinkoninik Asit
BSA	Bovin Serum Albumin (Sığır Serum Albümin)
IUIS	Uluslararası İmmünolojik Toplumlar Birliği

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Dünya nüfusunun % 25'i kadarını etkileyen alerjik reaksiyonlar, hassas yanıtı olan kişilerde yabancı maddelere (antijenler) tepki olarak vücutta İmmünoglobulin E (IgE) üretilmesi ile tetiklenir [1]. Avrupa nüfusunun % 15'i kadarı mevsime bağlı alerjik rinit, çocukluk çağındakilerin % 15-20'si atopik dermatit ve dünya genelinde ise 300 milyona yakın kişi astım rahatsızlığı çekmektedir [2, 3, 4].

Bitkilerin polenlenme ve bu polenleri dağıtma (disseminasyon) zamanı farklıdır. Buna ek olarak polen taneciklerinden kaynaklı antijen üretimini artıran hava kirliliği de farklı alerjik yanıtların oluşmasına yol açan diğer bir faktördür [5]. Yapılan çeşitli çalışmalar kapsamında kentsel ve kırsal bölgelerde yaşamını sürdüren kişilerin polen alerjisine karşı farklı immün yanıtlar verdikleri ve kentte yaşamını sürdüren kişilerde polen alerjisinin görülme sıklığının kırsalda yaşayanlara oranla daha çok olduğu saptanmıştır [6].

Alerjik reaksiyonlara neden olan en önemli molekül grubu proteinlerdir. Alerjik reaksiyonlara neden olan proteinler proteazlar, ligand bağlayan proteinler, yapısal proteinler, patojenez-ilişkili proteinler, lipid transfer proteinleri, profilinler ve kalsiyum bağlayan proteinler olarak işlevleri ve yapıları farklı çeşitli sınıflara ayrılırlar. Polen alerjisine neden olan grup ise patojenez-ilişkili 10 [PR-10] proteinler, profilinler, kalsiyum bağlayan proteinler ve ekspansinler olmak üzere dört ana gruba ayrılır [7, 8].

Bugüne kadar yapılan proteomik çalışmalar kapsamında polen alerjenlerinin genel itibari ile molekül ağırlıkları 10-70 kDa arasında, suda çözünebilen proteinler veya glikoproteinler oldukları, aralarından bazılarının yüksek pH'ya ve sıcaklığa dirençli oldukları saptanmıştır [9].

Dutgiller (Moreceae) ailesinden Ak Dut ağacı, Pavlonya (Scrophulariaceae) ailesinden Prenses Ağacı ve Meşegiller (Fagaceae) ailesinden Saplı Meşe Gaziantep'teki halka açık park ve bahçelerde yaygın olarak peyzaj amaçlı kullanılan ağaçlardır. Ak Dut polenlerinin özellikle polen saçma döneminde (Nisan-Mayıs) astım, alerjik rinit ve alerjik konjonktivit gibi alerjik tabloları tetiklediği bilinmektedir [10, 11, 12].

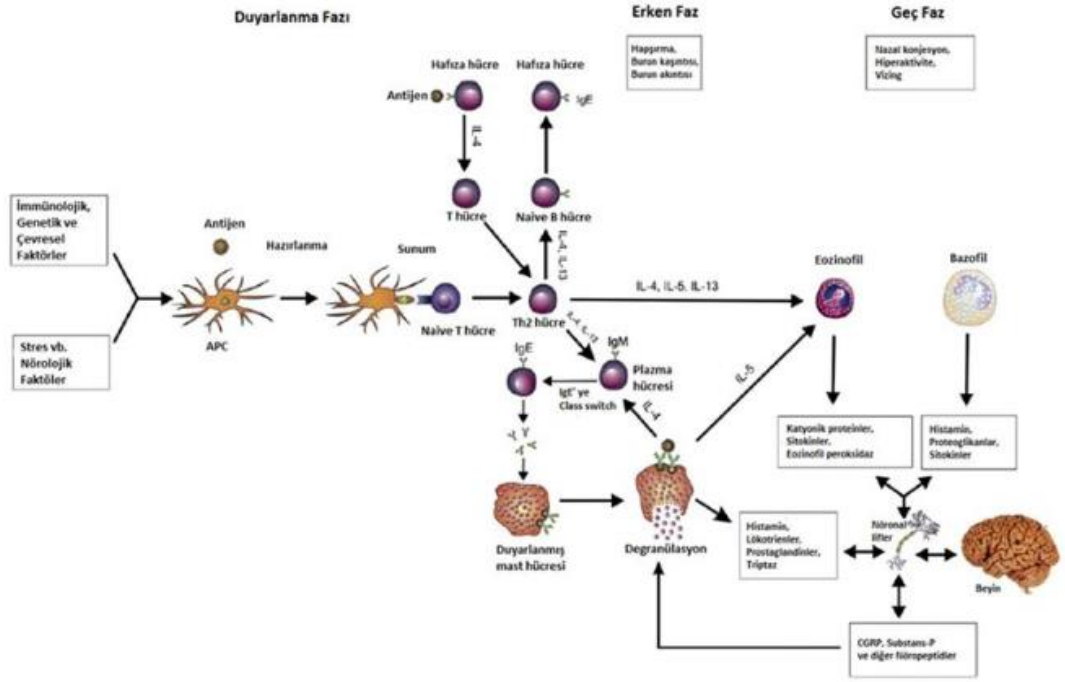
Bu tez çalışmasının amacı; Geçmişten günümüze kadar polen alerjisi üzerine yapılan proteomik çalışmalar ışığında Ak Dut (*Morus alba* L.), Saplı Meşe (*Quercus robur* L.) ve Prenses Ağacı (*Paulownia tomentosa* L.) polenlerinin alerjen protein konsantrasyonlarını belirlemek ve deri prick testlerde hali hazırda kullanılan ticari alerjen kitler ile alerjen protein konsantrasyonlarının kıyaslanmasıdır.

1.2 GENEL BİLGİLER

1.2.1 ALERJİ

Alerji, benzer orandaki antijenlere maruz kalan insanlardan bazılarının vücudunda gerçekleşen aşırı hassasiyet reaksiyonudur. Bu aşırı hassasiyet reaksiyonu doğal immün yanıt işlevinin bozulması ile ortaya çıkar. İmmün yanıtın neden olduğu bu bozukluklara aşırı duyarlılık hastalıkları da denmektedir. Aşırı duyarlılık reaksiyonları, üretilen antikor ve etki yoluna göre dört farklı gruba ayrılmaktadır. Bu gruplar Tip I, Tip II, Tip III ve Tip IV alerjik tepkimelerdir [13, 14].

Tip I olarak adlandırılan alerjik tepkimeler genel olarak saman kaynaklı nezle vakalarında görülür ve alerjenler vücut içerisinde IgE üretimini başlatır. Tepkime ile üretilmeye başlayan IgE, mast ve bazofil hücre yüzeylerine tutunur ve alerjenler ile tekrar karşılaştıkları zaman inflamatuvar aracı madde salgılanması ile alerjik tepkimeler gerçekleşir, bu duruma da alerjik reaksiyonun erken fazı (Şekil 1. 1) denir [14]. Alerjene maruz kalma süresine bağlı olarak geç faz (Şekil 1. 1) Tip I alerjik reaksiyon meydana gelir ve kronik inflamasyon olur.



Şekil 1.1 Alerjik Reaksiyonların Erken ve Geç Fazı

(<http://www.alerjiklinigi.com/alerjik-ve-non-alerjik/>, Erişim tarihi: 21.06.2019)

Tip II alerjik reaksiyon, IgG ve IgM antikorlarının varlığında oluşur. Bu antikorlar hücre membranı üzerinde alerjenle tepkimeye girerek hücre bozunmasına neden olur.

Tip III alerjik reaksiyonda, alerjenler IgG, IgM, IgA antikorlarla veya IgE'den oluşan kompleksler ile doku inflamasyonuna sebep olur. Bu tip yanıtlara genelde ilaç, yabancı türlerin serumları, yiyecekler, organik ve inorganik tozlar neden olur.

Tip IV alerjik reaksiyonlarda ise yanıtı gecikmiş aşırı duyarlılık olarak bilinir. Dokular üzerindeki inflamatuvar tepkime, alerjen tarafından uyarılmış T lenfositleri tarafından üretilen sitokinler aracılığı ile meydana gelmektedirler [9, 14].

1.2.2 Alerji Mekanizması

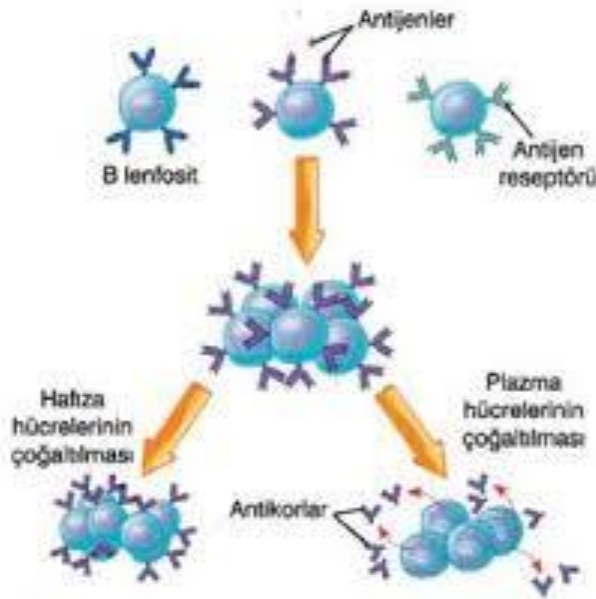
Alerji mekanizmalarında rol alan en önemli elemanlar; inflamatuvar aracı maddeler, değişik hücre yapıları ve değişik yolaklardır. Bu yolaklar içerisinde en önemlilerinden bir tanesi TH2 lenfositlerin düzenlenmesi ile IL-4 ve IL-5 salınımıdır. IL-4, TH0 hücrelerinden TH2 oluşumunu tetikleyerek B hücrelerinden IgE üretiminin başlamasına neden olur. Mast ve bazofil hücreleri üzerinde bulunan alerjen-IgE bağlanması, hücrelerin sitoplazmalarında bulunan granülleri serbest bırakmasına neden olarak inflamatuvar etki elemanlarının, lipid mediyatörlerin ve sitokinlerin sentezlenmesi ve salınmasına sebep olur. IL-5 ise erişkin kök hücrelerden eozinofil hücre oluşumunu tetikleyerek alerjik inflamasyon oluşumunu sağlar ve miktarı artırır [15].

Tip I alerjilerde önemli bir yere sahip olan IgE antikoru, 1967 yılında tanımlanmıştır [49]. Alerjik hastalıklarda verilen immün yanıtta önemli bir rol alan bu molekül temel olarak farklılaşmaya uğramış B hücreleri aracılığıyla üretilir. İki hafif ve iki ağır zincirden oluşmaktadır ve diğer sınıf antikorlardan farklılık gösterir. Ek olarak IgE antikoru IgG antikorundan farklı olarak; 4 ağır zincir sabit domeni bulundurmaktadır. Alerjenlerin bağlanma kısmı, ağır ve hafif zincirleri üzerindeki değişken domenlerde bulunur. Bununla beraber, IgE antikoru yüksek ve düşük afiniteli IgE reseptörlerine FC fragmenti ile bağlanır [16].

IgE antikorları ile beraber mast hücreleri de alerjik reaksiyonda önemli bir yer almaktadır. IgE antikorlarının mast hücreleri yüzeyindeki yüksek-afiniteli bağlanma noktalarına bağlanması ve alerjenlerin de IgE antikorlarına bağlanarak IgE'ler arasında çapraz bağlantı oluşmasının ardından mast hücreleri sitoplazma içeriğini dışarı vermek sureti ile degranüle olur [90]. Bu nedenle inflamatuvar histamin, triptaz, yeni üretilmiş lipid lökotrien C4, prostaglandin D2 ve sitokinler (TNF) salınmaya başlar [17].

IgE bağlanması ile başlayan mast hücrelerinin aktivasyonunun dışında; IgE, B hücrelerinin yüzeyinde bulunan ve düşük afiniteye sahip bağlanma noktalarına da bağlanarak bu hücrelerin işleyişini etkiler [90].

Bunun yanında, IgE antikoru ile ilişkili bağlantı noktası üretimi B hücreleri yüzeyinde bulunan reseptörler üzerinde de etkiye sahiptir. IgE antikoru seviyesindeki yükseliş B hücreleri üzerindeki reseptörlerinin de artmasını sağlayarak alerjik yanıtın oluşmasına katkıda bulunmuş olur [4].



Şekil 1.2 Hücre Reseptörü

(https://www.google.com/search?q=b+h%C3%BCcre+resept%C3%B6r%C3%BC&safe=active&rlz=1C1GCEA_enTR809TR809&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiz9paQsqPjAhWsxAYKHe43CvsQ_AUIESgC&biw=1366&bih=657#imgc=00uEz56Gy0YDRM:)

1.3 Alerjiyi Tetikleyen Çevresel Etmenler

1.3.1 Alerjenler

İç ortamlardaki alerjenler ev akarı tozu, kedi ve köpek tüyü, Aspergillus, hamam böcekleri başta gelmektedir [58]. Bu alerjene maruz kalan bireylerin duyarlılaşması, alerjenlere maruz kalması, ne kadar süre maruz kaldığı, yaşı ve genetik yatkınlıklarına göre değişmektedir [19, 20, 21]. Erken yaşta ki maruziyetin alerjik etkileri arttırdığı, astıma sebebiyet verdiğini savunan çalışmaların yanı sıra tam tersini yani vücudun bağışıklılığını arttırdığını savunan çalışmalarda mevcuttur [22, 23, 24].

Ayrıca kırsal kesimde yaşayanların alerji ve astım prevalansı şehir merkezinde yaşayanlara oranla kıyaslandığında genel olarak daha düşük olduğu belirlenmiştir [25].

1.3.2 Enfeksiyonlar

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarla çocuk yaşta ortaya çıkan astım ataklarının birçoğunun solunum yolu enfeksiyonları ile ilgili olduğu belirlenmiştir. En sık rastlanan virüsler ise solunum sinsistyal virüsü, adenovirüs, influenza virüsleri tip A ve B, rinovirüs, parainfluenza virüsleridir [26, 27].

Bu virüslerin alerji mekanizmasını tetiklemesi, kalıcı hasara yol açması, astıma yol açması ve karmaşık patojenik mekanizmaları başlatması birçok çalışma ve tartışmaya konu olmuştur [28]. Bunun yanı sıra bazı karşıt çalışmalarda ise RSV ve kızamık gibi erken çocukluk dönemi hastalıklarının astıma karşı koruyucu olabileceği öne sürülmektedir [29, 30].

'Hijyen hipotezi' olarak öne sürülen bu çalışmada enfeksiyonlara erken dönemde maruz kalmanın, bireylerin immün sistemini nonallerjik yola yönlendirerek alerjik ve astım hastalıkları riskini azaltacağı düşünülmektedir [31].

1.3.3 Sigara

Doğum öncesi ve sonrası sigara dumanına maruz kalan çocukların akciğer gelişimini olumsuz yönde etkilediği ve alerji, astım riskini önemli ölçüde arttırdığı bilinmektedir [32]. Tütün ürünlerine maruz kalan erişkinlerde akciğer hassasiyeti ve astım riski de artmaktadır [33].

1.3.4 Hava Kirliliği

İç ortam havası dış ortama göre çok daha fazla kirlletici bulundurmaktadır. İç ortam kirlleticileri ise tütün dumanı ve buharları, pestisid içeren temizlik malzemeleri, binanın yapımında kullanılan boya, izolasyon maddeleri, küf, ev akarları, hamam böcekleri en yaygın olanlardır. Bu maddelere maruziyet akciğer hassasiyeti ve astım ile ilişkilendirilmiş en yaygın kirlleticilerdir [32]. Dış ortamda hava kirliliğine maruz olan bireylerde akciğer gelişiminde kısıtlanma olmakla beraber, astıma neden olup olmadığı bilinmemekte ve tartışılmaktadır [34].

Hava kirliliğindeki artmalarla birlikte astım alevlenmelerinin de arttığı yönünde birçok çalışma mevcuttur [35, 36].

1.3.5 Diyet

Astım ve alerjik hastalıkların gelişiminde çok fazla hazır gıda tüketimi, antioksidan yönünden zengin sebze ve meyve tüketiminde azalma, margarin ve işlenmiş yağlarda bulunan doymamış yağ asitleri alımında azalmanın risk faktörlerini arttırdığı saptanmıştır [37].

Yeşil gıdalarla beslenme, C,E,D vitaminleri içeren besinler ile beslenmenin astım gelişimi açısından olumlu yönde etki ederek astım riskini azalttığı bazı çalışmalarla gösterilmiştir. Fakat çocuk ve erişkinlerde astımı önlemek ve astım semptomlarını düzenlemek amacı ile diyete ek antioksidan alınımını desteklemektedir [38].

1.4 Alerji Hastalarında Klinik Bulgular

Allerjik rinit (AR), klinik tablolarda nazal mukozanın alerjene maruz kalmasından sonra ortaya çıkan IgE antikoru bağlantılı aşırı duyarlılık ile karakterize, burnun inflamatuvar semptomlu bir hastalığı olarak bilinir. IgE'nin bazofil ve eozinofile etkisi ile birçok mediator aktif hale gelerek mukozal ödem, mukus salgısında artış ve vasküler permeabilite artışı yoluyla burun tıkanıklığı, burun akıntısı, hapşırma ve diğer bulguları oluşmaktadır [39].

AR'li hastalarda allerjenin tespit edilmesi, korunma ve immünoterapi için çok önem teşkil etmektedir. Allerjenler, *in vivo* cilt testleri (deri prick testler) ile ya da *in vitro* (serolojik) testler ile belirlenir. *In vitro* testler arasında IgE ölçümü, histamin testi ve

alerjen IgE ölçümü yer alır. Alerjen IgE tespitinde immünoradiometrik teknikler (RAST, F/N Mrast, ELISA, vb) kullanılır [40].

1.5 Klinik ve Laboratuvar Destekli Alerji Tanısı

1.5.1 Alerjen Deri Testi (Skin Prick Test)

Alerjen deri testi (SPT) ilk olarak 1973'te Blackley tarafından polen duyarlılığını göstermek amacı ile tasarlanmış bir yöntemdir [41]. Bu yöntem bebeklerde ve çocuklarda alerjen duyarlılığına bakmak için pratik ve son derece güvenli bir yoldur. Bu yöntemde standart tek veya çift-eğimli lanset kullanılarak, az miktarda standardize edilmiş alerjen epikütan olarak verilir. Alerjik bireyin vücudunda, uygulaması yapılan alerjene karşı histamin salgılanıp salgılanmadığı deri üzerindeki kızarıklık çapına göre değerlendirilip pozitif veya negatif reaksiyon olarak belirlenir. Deri üzerinde meydana gelen kızarıklık veya benzeri yapının çapı mm cinsinden ölçülür ve elde edilen sonuç, pozitif kontrol olarak uygulanmış histamin'in deri üzerinde oluşturduğu kızarıklık çapı ve negatif kontrol olarak uygulanmış çözücü'nün kızarıklık çapı ile kıyaslanır. Oluşan kızarıklığın çapı genel olarak ≥ 3 mm olduğunda pozitif reaksiyon olarak kabul edilmektedir [42, 43, 44].

Deri prik testi ve uygulanan diğer tanı yöntemlerine ek olarak tanının güvenilirliğini artırmak amacı ile uygulanan diğer bir test ise nazal provakasyon testidir. Bu test, kontrollü olarak uygulaması yapılan alerjenlere karşı nazal mukoza bölümünde oluşabilecek yanıtın anlaşılmasına olanak sağlar. Bu tepki; kaşınma, aksırma, burun akıntısı, nazal mukozada ödem oluşumu ve hava akımına karşı oluşan direnç ile tanımlanır [45].

Klinikte kullanılan in vivo tanılama yöntemlerine ek olarak teknolojik ilerlemeler sayesinde yeni laboratuvar testleri de geliştirilmiştir. Alerjen-spesifik IgE antikorlarının serum içerisindeki veya bazofil hücreleri üzerindeki miktarları in vitro olarak saptanabilmektedir. In vitro yöntemler; net miktar belirlenmesi, güvenilirlik ve ilaç reaksiyonlarını ortadan kaldırması gibi pozitif yönleri sahiptir [46].

Alerjen-antikor ilişkisinin saptanabildiği ELISA testinde ise plastik yüzey üzerine kaplanmış antijenlere karşı antikor varlığı enzim ile işaretlenmiş ikinci bir antikor ile araştırılır. Son zamanlarda ise mikroçip teknolojisi, saflaştırılmış doğal alerjenlere veya geliştirilmiş alerjenlere karşı IgE ölçümüne olanak sağlamaktadır. Bu teknoloji

sayesinde düşük miktardaki serum örneğinde bile çok sayıda alerjene karşı spesifik IgE belirlenmesini mümkün kılmaktadır [47, 48, 49].

1.6 ALERJENLER

İmmün sistemin uyarılmasını sağlayan ve alerjik reaksiyonların oluşmasına sebep olan antijenlere **alerjen** denir. Çoğu alerjen biyolojik menşeli olup temel inhalan alerjenler; polenler, mantarların (küf, fungus) sporları, bakteri, ev tozu akarları, evcil hayvan epidermisleri, bazı yiyecek alerjenleri ve böcek ağlarını kapsamaktadır [50]. Doğal çevreden köken alan ve tanımlaması yapılan birçok inhalan alerjenler ortalama 10-50 kDa arasında olan ve suda çözünebilen proteinler veya glikoproteinlerden oluşmaktadırlar [5].

Proteinlerin alerjenitesi, genelde iki açıdan incelenir: İmmünojenisite ve çapraz reaksiyonlar sırasında gösterdikleri özelliklerdir. **İmmünojenisite**, bu proteinlerin IgE antikorunun salınmasını tetikleme özelliğini; **çapraz reaksiyonlar** ise IgE antikorunun hedef alınan proteinle reaksiyona girebilme özelliğini belirtir. Bunlara ek olarak protein(lerin) IgE bağlayabilme potansiyeline ek olarak klinik bulgu oluşturabilmesi de önemlidir çünkü proteinlerin klinik bulgu oluşturmada fiziksel özellikler ve immünolojik özellikler önemlidir.

Bugüne kadar yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda birçok farklı kaynaktan önemi yüksek alerjen proteinler izole edilmiş ve belirlenmiştir. Bu belirlenen alerjenler, özellikleri ve yapılarına göre farklı protein ailelerinde sınıflandırılmıştır.

En çok tanınan alerjenler, spesifik olmayan lipid transfer proteinleri, depo proteinleri, patogenez-ilişkili protein ailesi 10 proteinleri, profilinler, kalsiyum bağlayabilen proteinler, serum albüminler, tropomiyosinler ve lipokalinler gibi protein ailelerinin üyeleridir [49].

Alerjenlerin tümü için ya da epitopları için bilinen tek bütünleştirici yapı yoktur. Ancak her bir tür, bu türe ait özel alerjen epitopuna sahiptir ve bu epitopa karşı üretimi yapılan antikorlar, sadece bu türe ait olan epitopuna bağlanır. Bununla beraber biyolojik olarak birbirlerine yakın olan türlerde aynı ya da benzer yapılarda alerjenler bulunabilir. Bir proteine karşı üretimi yapılan antikorlar aynı ya da benzer yapıda üretimi yapılan farklı türlerin proteinlerine de bağlanabilme özelliği

gösterebilirler. Bunların sonucu olarak cross-reactivity (“çapraz bağlanma”) olarak adlandırılan reaksiyon gerçekleşir [49, 99].

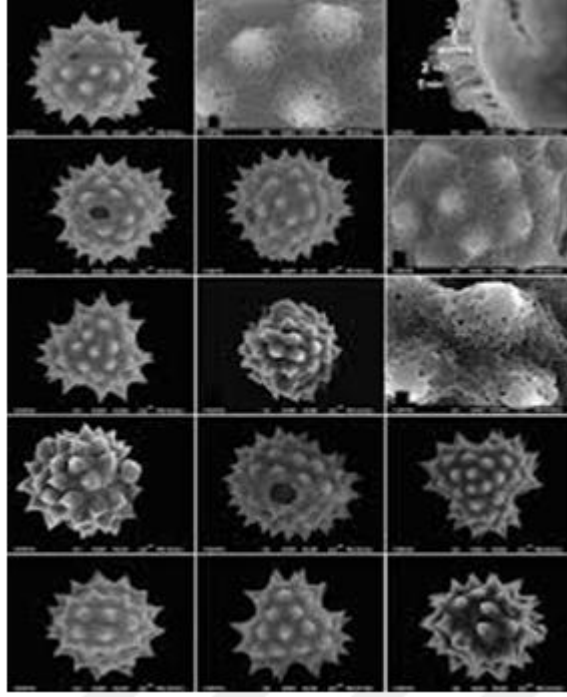
Alerjik bir reaksiyonun tetiklenmesi için, IgE antikoru Fab kolu sayesinde antijene, Fc kolu ile de mast ve bazofil hücrelerinin yüzeyinde bulunan spesifik antikor reseptörlerine (FcεRI) bağlanır. Minimum iki IgE molekülünün antijene bağlanması durumunda ise FcεRI reseptörleri arasında çapraz bağlanma olarak adlandırılan durum meydana gelir ve hücre içi sinyalleşme başlamış olur [47].

Yapılan araştırmalarda, proteinlerin biyolojik aktivitesinin de alerjenite üzerinde etkisinin olduğu saptanmıştır [52]. Enzimatik aktivitesi olan proteinlerin alerjenik reaksiyonları başlatma olasılıkları daha yüksektir ve alerjenler çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olabilirler. Belirlenen bazı alerjen mekanizmalarında biyolojik aktivitesinin alerjenlerin etkinliği üzerine doğrudan katkısı olabileceği iddia edilmektedir [53].

1.6.1 Polen Alerjenleri

Polenler, çiçekli bitkilerin erkek gametlerini bulduran bölümlerdir. Biyolojik işlevi dişi gametofitini dölemektir. Polenler doğada çeşitli şekil ve boyutlarda (12-300 µm çapında) bulunabilirler. Polen taneciklerinin dış yüzeyi **ekzin** olarak isimlendirilir ve **sporopollenin** olarak adlandırılan bir tabakadan meydana gelir. Bu yapı polen taneciklerini fiziksel ve kimyasal etkilerden korumada büyük rol oynar. İntin ise polen yapısı ve şeklini desteklemese bile içeriğinde organeller, vejetatif ve generatif hücreleri bulduran sitoplazmayı sarar [54, 55].

Polenlerin neden olduğu alerjenler genelde suda çözünebilen proteinler ya da glikoproteinlerdir. Bu proteinler genellikle 10-70 kDa arasında moleküler ağırlığa sahiptir ve bazılarının sıcaklık ve pH toleransları değişmektedir [9]. Polen alerjenlerini belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda bu alerjenlerden başlıcaları; Bet v homolog proteinler, profilinler, kalsiyum bağlayan proteinler ve ekspansinler olmak üzere dört grupta incelenmektedirler [13, 8]. Alerjik reaksiyona neden olan ve bilinen başlıca polen alerjenleri ile alerjen kaynakları Tablo 1.1’de belirtilmiştir.



Şekil 1.3 Çeşitli Polen Tiplerinin Elektron Mikroskobu Görüntüsü

Tablo 1.1 *Morus nigra* L.ve *Quercus robur* L Tanımlanan Bazı Alerjen Proteinler

	<i>Morus nigra</i> L	<i>Quercus robur</i> L
Alerjen	Mor n 3	Que a 1
Tip	Ağaç	Ağaç
Anahtar kelime	Nonspecific lipid transfer protein type 1	Pathogenesis related protein PR10
Sınıf	IUIS	IUIS

1.7 Bitki Sistematiikleri ve Genel Bilgiler

1.7.1 *Morus alba* L. (Akdu) Taksonomi

Sınıf: Equisetopsida

Altsınıf: Magnolididae

Üsttakım: Rosanae

Takım: Rosales

Familya: Moraceae

Cins: *Morus*

Tür: *Morus alba* L.

Dutgiller (Moraceae) ailesinin üyesi akdu (*Morus alba* L.) temel olarak Çin, Japonya, Tayland ve Malezya menşelidir. Günümüzde Doğu ve Batı Amerika dahil olmak üzere dünya genelinde yetişebilmektedir. *Morus alba* L. Çin'in doğal bir türüken, *Morus nigra* L. (Kara Dut) İran'ın, *Morus rubra* L. (Mor Dut) ve *Morus microphylla* Buckl. (Texas Dutu) Kuzey Amerika'nın doğal türlerindedir. Ayrıca *Morus australis* (Çin Dutu), *Morus indica* (Hindistan Dutu), *Morus serrata* (Himalaya Dutu) türleri de bulunmaktadır. Türkiye'de ise Erzincan, Elazığ, Ankara, Malatya ve Tunceli olmak üzere hemen her bölgede yetişmektedir [56].

Bu türün ağaçları, genellikle 18-20 m boylarına ulaşabilen, kışın yapraklarını döken ve geniş görünümlü bir yapıya sahiptir. Derin topraklı bölgelerde daha iyi gelişme göstermektedir. Ilıman iklimde, sıcak, güneşli bölgelerde de gelişme gösteren bitki soğuk hava şartlarına da dayanıklıdır. Gövde kabuk kısmı hafif gridir ve yaprakları yeşil, kalp şeklindedir (Şekil 1.2). Akdu ağacı ilkbaharda çiçek açıp 2 cm uzunluğunda yeşile çalan sarı renkte çiçekler açmaktadır. Meyve büyüklükleri farklılık göstermekle beraber beyaz, beyaz-pembe renktedir (Şekil 1.9). Bu ağaçlarda polen yayılımı rüzgar yolu ile gerçekleşmektedir.

Ak Dut polenlerinin neden olduğu rahatsızlıklar içerisinde astım, alerjik rinit ve alerjik konjonktivit gibi alerjik hastalıklar vardır [12].



Şekil 1.4 *Morus alba* L. genel yaprak, dal, meyve görüntüsü

(<http://www.gezenadam.com/flora/AI.php?ID=40> Erişim Tarihi: 21.06.2019)



Şekil 1.5 *Morus alba* L. genel yaprak, dal, meyve görüntüsü

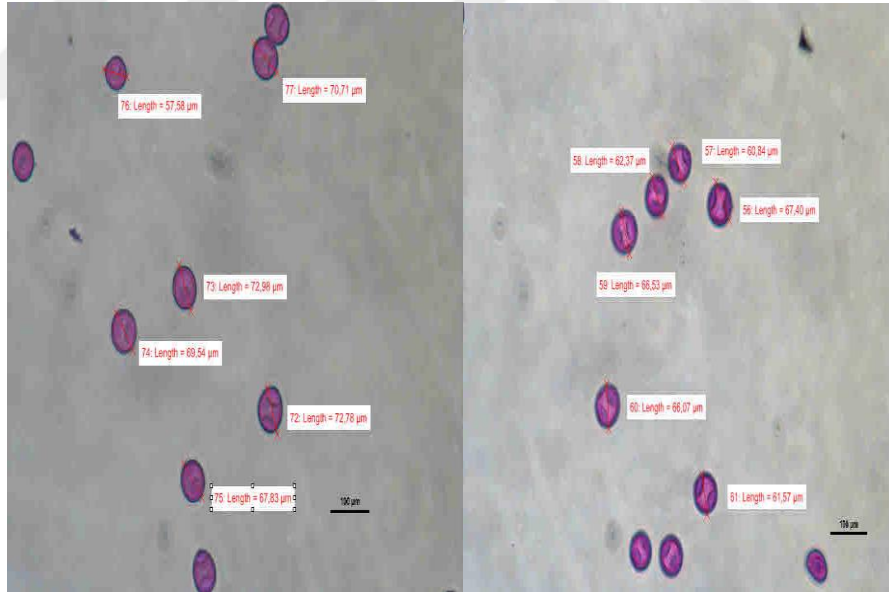
(<http://www.gezenadam.com/flora/AI.php?ID=40> Erişim Tarihi: 21.06.2019)

Ak Dut polenlerinin alerjenitesi ile ilgili literatürde geniş bir bilgi yoktur. Dolayısıyla günümüze dek bu ağaç polenlerinden herhangi bir alerjen protein de tanımlanmamıştır. Bu çalışma ile alerjenitesi belirlenen Ak Dut polenlerinin IgE bağlayan proteinleri saptanmış, daha önceden tanımlanmış alerjenlerle karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve potansiyel alerjenik proteinler bulunmuştur. Böylece alerjenlerin tanımlanması ve alerji panellerinin genişletilmesi için yürütülecek çalışmalara bir temel oluşturulmuş, alerjik hastalıkların tanı ve tedavisine yeni bir bakış açısı getirilmesi amaçlanmıştır [12].



Şekil 1.6 *Morus alba* L. Çiçek ve Yeni Oluşan Yaprakları ve Meyvesi

(<https://www.dinlence.xyz/2018/12/04/dut-meyvesi-ozellikleri-ve-faydaları/> Erişim Tarihi: 21.06.2019)



Şekil 1.7 *Morus alba* L. Polen Görüntüsü X40

1.7.2 *Quercus robur* L. (Saplı meşe)

Sınıf: Equisetopsida

Altsınıf: Magnoliidae

Üsttakım: Rosanae

Takım: Fagales

Familya: Fagaceae

Cins: *Quercus*

Tür: *Quercus robur* L.

Kayingiller (Fagaceae) familyasına ait olan bu ağaç türü temel olarak karışık ormanlarda ve dünya üzerinde güneş alan tüm alanlarda yayılış gösterebilen bir ağaç türüdür. Boyutları 30-40 metre civarında olan, 2m'ye kadar genişliğe ulaşan, geniş, dağınık ve oval taç görünüşlü bir ağaçtır. Yaprakları çok kısa saplı olup, dip tarafa doğru daralma göstermektedir ve iki adet kulak memesi görünümünde bir yapı ile sonlanır. İki yüzü tüysüz, üst yüzeyi koyu yeşil, alt yüzeyi ise mavimsi-yeşildir. Ağacın yetişmesi için uygun olan toprak kil ve alüvyon içeren yapıya sahip, Ph 4.5-7.5 değerlerine sahip, genel olarak ortalama yağışın 350 mm'nin üzerinde olduğu ve su tutma kapasitesi yüksek olan topraklardır [103].

Türkiye üzerindeki dağılımı genel olarak Akdeniz ve Ege bölgesinde çok yayılım göstermez. Bu bölgeler haricinde tüm bölgelerimizde bu ağaç türü yayılış göstermektedir. Halk arasında Meşe ağacı kabuklarından yapılan çayların, mide ve bağırsak kanamalarına iyi geldiğine inanılır [103].



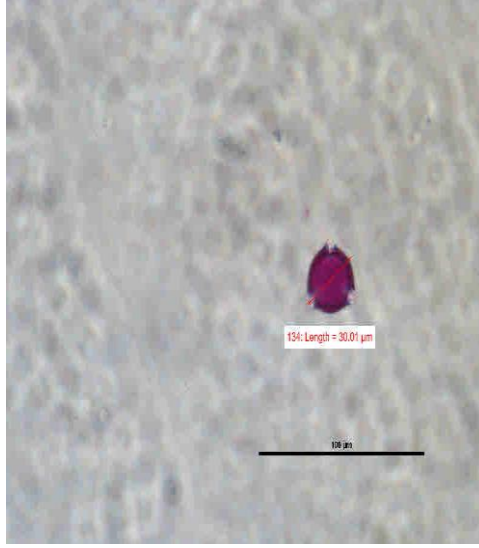
Şekil 1.8 *Quercus robur* L. genel yaprak, dal, meyve görünümü

(<https://travel.sygi.com/en/poi/quercus-robur-poi:20376558> Erişim Tarihi: 21.06.2019)



Şekil 1.9 *Quercus robur* L. Yaprak ve Palamut Görünümü

(<https://nurserylive.com/buy-medicinal-seeds-online-in-india/quercus-robur-english-oak-0-5-kg-seeds-plants-in-india> Erişim Tarihi: 21.06.2019)



Şekil 1.10 *Quercus robur* L. Polen Morfolojisi X40



Şekil 1.11 *Quercus robur* L. Polen Morfolojisi X40

1.7.3 *Paulownia tomentosa* (Prenses Ağacı)

Sınıf: Magnoliopsida

Üsttakım: Asteranae

Takım: Lamiales

Famılya: Paulowniaceae

Cins: Paulownia

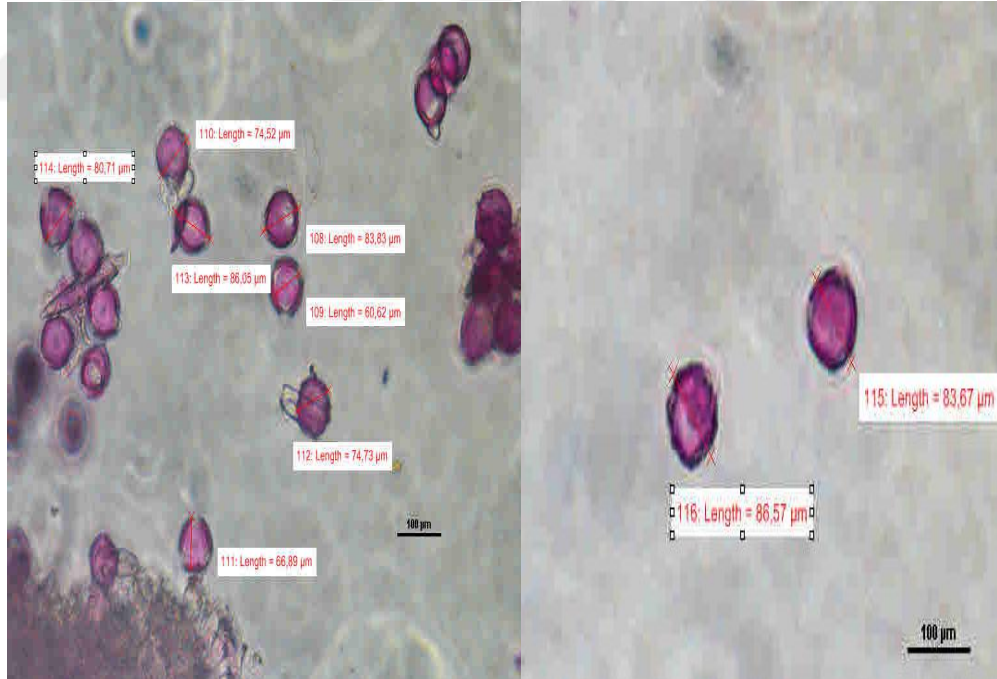
Tür: *Paulownia tomentosa*

Scrophulariaceae familyasına ait bir ağaç türü olan *Paulownia tomentosa* diğer adıyla Prenses Ağacı ya da Tüylü Pavlonya olarak bilinmektedir. Bu ağaç türü genellikle 7-15m arasında uzunluk göstermektedir. Koyu gri gövde kabuğu genç dönemlerinde çatlaksız ve lentiseller belirgindir, ileri yaşlarda bir metreye kadar çap yapabilmektedir. Kışın yaprak döken bu ağaç türü 15-30 cm boyunda, 10-20 cm genişliğindeki kalp biçimli yaprakların sapları 10-15 cm uzunluğundadır. Sivri uçlu, bazen 3 hafif loplu olan yaprakların üst yüzü yeşil, alt yüzü gri-yeşil renkli ve tüylüdür. Genel olarak ılıman iklimlerde sıcaklık istekleri yüksektir. Kaba yapılı topraklarda, hafif ve orta killi topraklarda rahatlıkla yetişirler. Bu ağaç türünün alerjik reaksiyonlara katkısı ve içerdiği alerjenler ile ilgili tanım literatürde bulunmamaktadır (<http://agaclar.org/agac.asp?id=1068> Erişim Tarihi: 21.06.2019).



Şekil 1.12 *Paulownia tomentosa* L. Genel Görünümü

(<https://www.frozenseeds.com/products/empress-tree-seeds-paulownia-tomentosa>
Erişim Tarihi: 21.06.2019)



Şekil 1.13 *Paulownia tomentosa* L. Polen Morfolojisi X40

1.8 Alerjenik Protein Tanımlanmasında Kullanılan Stratejiler

Son dönemlerde, proteomik metodlar alerjik reaksiyon çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Alerjenler üzerine yapılan çalışmalar ve tanımlanmış alerjenlerin sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Bunlardan çoğu amino asit dizisi şeklinde veri bankalarına kaydedilmiş olup farklı alerjen grupları şeklinde sınıflandırılmıştır. Bu sayede protein gruplarına ait veriler yeni alerjenlerin tanımlanması açısından da önem taşımaktadır [57]. Bu tanımlama stratejileri kullanılarak elde edilen alerjen proteinler standart hale getirilerek alerji testlerinde kullanılmaktadırlar. Ayrıca daha sonra yapılacak polen ve alerji çalışmaları içinde kaynak oluşturmaktadırlar.

Daha önce tanımlanmamış yeni bir alerjenin tanımlanması için iki esas yaklaşım izlenebilir. Bu yaklaşımlardan ilki, protein ayırma ve protein tanımlama yöntemlerinin birleşimi, diğeri ise protein mikroçip yöntemidir. Genel itibariyle ilk yaklaşım yeni bir alerjenin bulunmasında çok tercih edilirken, protein mikroçip yaklaşımı genel olarak klinik uygulamalarda hangi alerjene hassasiyet olduğunu tespit etmede kullanılmaktadır [58].

Alerjik reaksiyona neden olan bir kaynaktan izole edilen proteinlerin ayrışımı alerjen tanımlanmasında ilk basamağı oluşturmaktadır. Elde edilen bu proteinlerin ayrıştırılmasında temel olarak kullanılan yöntem iki boyutlu jel elektroforez yöntemidir. Bu metotta proteinler moleküler ağırlıklarına göre ayrılırlar. Ayrırım işleminin ardından jel boyanarak proteinler görünür hale getirilir [59].

Spesifik alerjen IgE tespitinde immunoradiometrik yöntemler (RAST, mRAST, ELİSA, kemilüminometrik analiz) kullanılır. RAST (Radio Allergo Sorbent Test) sisteminin içerisinde bilinen en etkili testtir. Duyarlılığı %60-80 olan özgüllüğü ise %90'dan fazladır. RAST pozitif ise hastalar büyük oranla IgE duyarlıdır [60].

Nazal smear ise alerjik ve alerjik olmayan rinitlerde, özellikle enfeksiyona bağlı gelişen hastalıkların tanısında kullanılır. Burun akıntısı lam üzerine yayılıp giemsa ise boyanarak ışık mikroskobu yardımı ile incelenir. Eozinofil hücreleri sayılarak toplam hücre sayısına oranı %15'den fazla ise nazal eozinofilden bahsedilir.

Duyarlılığı düşük fakat özgülüğü yüksek bir testtir. Eozinofilin görülmemesi ya da az görülmesi alerjik riniti ekarte ettiremez [61, 60].

Deri prick testi, hazır olarak bulunan alerjen çözeltileri lanset, steril enjektör uçları yada özel olarak hazırlanmış alerjen iğneleri ile deriye enjekte edilerek uygulanır. Deriye küçük çizikler atılarak alerjenin deriye sızması ile kızarıklık, kaşıntı, şişme gibi tepkiler beklenir [62]. Pozitif deri testi sonuçları bireyde her zaman alerjik bir bünyeyi göstermez. Birçok kişide deri testleri duyarlılığı saptandığı halde bu bireylerde herhangi bir alerjik hastalık olmadığı görülmektedir. Bu tip bireyler 'asemptomatik atopik' olarak tanımlanır [63].

İntradermal test ise prensip olarak deri prick testi ile aynıdır. Hazır alerjen kitlerindeki soslüsyonlar derinin biraz daha altına enjekte edilerek uygulanır. Vücudun tepkisi beklenerek sonuçlandırılır. Cilt testleri yapılmadan önce kullanılan ilaçlar sonuçları olumsuz etkileyebilir bu sebeple antihistaminik ilaçlar test yaptırmadan bir hafta önce kullanmayı bırakmak gerekir [64].

Yama testi kontakt dermatit (temas egzeması) olan hastalara uygulanır. Egzemaya sebep olan maddeleri belirlemek amacı ile deriye yapıştırılan bir bant ile 48 ile 72 saat bekletilerek sonuç alınabilir.

Kan testlerinde ise IgE miktarını ölçmek için yapılır.

BÖLÜM 2 LİTERATÜR ÖZETİ

Demirhan (2014) tarafından yapılan çalışmada İstanbul'da yaygın olarak bulunan Ak Dut ve Mavi Atlas Sediri polenlerinin alerjenik proteinleri araştırılmış, bu araştırma sonucunda polen proteinleri ekstre edilmiş ve bu ekstralar önceden çeşitli ağaç polenlerine alerjik olduğu saptanmış hastalara ve sağlıklı olduğu bilinen bireylere deri prik ve nazal provokasyon testleri ile uygulanmış ve veriler değerlendirilmiştir. Daha sonra uygulanan yöntemler ve yapılan deneyler ile birlikte ortaya çıkan veriler sonucunda tanımlanan alerjenik proteinler veri bankaları ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

Feridun (2015) tarafından yapılan tez çalışmasında Avrupa'da yayılış göstermeyen *Alnus orientalis* polenlerindeki majör alerjenlerin kromatografik yöntemlerle saflaştırılması amaçlanmış ve bunu sağlamak için toplanan polen örnekleri SDS-PAGE ve Western Blot yöntemi kullanılarak immüno blotlar yapılmış ve majör alerjenlerin belirlenmesi, bu immüno blotlar ile Betulaceae familya taksonlarından en az birine karşı duyarlılığı olan 40 olgu ve kontrol grubu olarak 40 non-atopik olgu üzerinden gerçekleştirilmiş, belirlenen majör alerjenler çeşitli yöntemler ile saflaştırılmıştır.

Evren (2005) tarafından yapılan yüksek lisans çalışmasında Trakya bölgesinde üretimi yapılan Gramineae familyasına ait 5 türün (*Triticum aestivum* L. *Sacale cereale* L. *Oryza sativa* L. *Avena sativa* L. *Hordeum vulgare* L.) alerjen polenlerinin morfolojileri ışık ve elektron mikroskobu ile incelenmiş ve bu türlerden polen ekstraları hazırlanmıştır. Elde edilen ekstralar ve morfolojik incelemeler daha sonraki çalışmalara kaynak sağlamak açısından kaydedilmiştir.

Şahin (2015) tarafından yapılan yüksek lisans tez çalışmasında İstanbul'da yayılış gösteren Servigiller ailesinden Akdeniz Servisi ve Sabin Ardıcı polenlerinin alerjenik proteinleri araştırılmış. Polenler tozlaşma dönemlerinde toplanarak polen ekstraları hazırlanmıştır. Hazırlanan polen ekstraları belirli oranlarda dilüe edilerek alerjik rinit hastalarına ve herhangi bir alerjik reaksiyon gözlenmemiş olan sağlıklı bireylere deri prik ve nazal provokasyon testleri ile uygulanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda klinik testler ve deneysel aşamalar birleştirilerek değerlendirilmiştir. Bu veriler doğrultusunda alerjen protein tanımlamaları yapılarak veriler kaydedilmiştir.

Arif Hikmet (2013) tarafından yapılan uzmanlık tezinde Denizli ili bölgesindeki atmosferdeki polen ölçümünü gerçekleştirip, bununla beraber aynı zamanda alerjik rinit klinik tanılı hastaların kliniklere başvuru sıklığı ve hasta şikayeti arasındaki ilişkisinin karşılaştırılması amaçlanmış ve bu araştırmalar sonucunda aylara göre kulak burun boğaz alerji polikliniğine başvuran hasta sayısı ile toplam polen yükü arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Hastaların başvuru semptom skoru ile toplam polen yükü arasında anlamlı ilişki saptanmıştır.

Nazan ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan çalışmada Gaziantep bölgesindeki olgularda duyarılama oluşturan solunumsal alerjen spektrumunu belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışma kapsamında alerjik hastalıklarla uyumlu şikayetlerle hastaneye müracaat eden olguların deri prik test sonuçları retrospesifik olarak belirlenmiş, deri prik testi uygulanan 1627 hastadan 528'i 8 alerjiden en az birine karşı duyarlanma gösterdiği saptanmıştır. Çalışma kapsamında en sık rastlanan alerji etkeni *Phleum pratensis L.* olduğu saptanmıştır.

Nilgün (2009) tarafından Gaziantep ilinde yapılan çalışma kapsamında Kronik öksürük şikayeti ile hastaneye başvuru yapan çocuklarda allerjen profili belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda yapılan çalışma sonucunda çalışmaya dahil edilen 240 çocuktan 137'sinde en az bir alerjene karşı duyarlılık saptandığı bildirilmiş, en sık duyarlılık %50,4 ile çimen polenlerine karşı saptanırken, ikinci sırada %24,6 ile ev tozu akarları, üçüncü sırada ise %23,3 ile buğday poleninin geldiği bildirilmiştir. Çalışma kapsamında deri prik testleri esas alınmıştır.

Gennaro ve arkadaşları (1991) tarafından yapılan bir çalışmada Avrupa'daki aeropalinoloji istasyonlarında izlenen ve en çok allerjiye neden olan 15 takson listesi belirlenmiş ve bu liste içerisinde *Quercus* taksonunun da bulunduğu belirtilmiştir.

Perihan ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan çalışmada hava yollu yayılım gösteren polenlerin Tekirdağ bölgesinde cm^2 'de 2 yıl içinde düşen polen miktarlarının ölçümleri ve takson araştırılması amaçlanmıştır, çalışma kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda araştırılan bölgede en çok bulunan polenler arasında *Quercus spp.* polenlerinin olduğu belirtilmiştir.

Yapılan literatür araştırmalarında *Paulownia tomentosa* polenleri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Geniş kapsamlı olan polen alerjenleri üzerine yapılacak çalışmalarda ülkemizin iklim koşulları dolayısıyla sahip olduğu geniş bitki çeşitliliği uygun koşullar sağlamaktadır. Öncelik halk sağlığı için peyzajda sık kullanılan bitkilere verilmesi yaşam standartlarını ve kalitesini yükselteceği düşünüldüğünden bu bitkilere verilmeli ve yapılacak çalışmalara öncülük sağlaması amacıyla hazırlanan bu tezden faydalanılması bizler için gurur vericidir. Literatür taraması sonucunda alternatif deri prik testi kitlerinin hazırlanması ve standart hale getirilmesi ile ilgili kapsamlı çalışmalara da rastlanmamıştır. Bu açıdan yapılan bu yüksek lisans tezinin özgün bir çalışma ve diğer yapılacak çalışmalar için kaynak niteliğinde olacağı düşünülmektedir.

BÖLÜM 3

MATERYAL METOD

3.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Elek (Test eleği, Türkiye)
- Pipet (Ependorf, Research Plus, Almanya)
- Saf su cihazı (Merck, ABD)
- Etüv (Selekta, İspanya)
- Buz dolabı (+4, Vestel, Türkiye)
- Hassas terazi (Denver Instrument, Precissa, İsviçre)
- Otoklav (HMC Hiroyama, Japonya)
- Santrifüj (Heittich, Almanya)
- Vorteks (Velp Scientifica, İtalya)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD)
- Desikatör
- Vakumlu desikatör
- İnvart mikroskop (Nicon Eclips, ABD)
- Pasteur pipet tabancası (Capp Aid, Danimarka)

3.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

- Etanol (%96, Merck, Almanya)
- Aseton (Merck, Almanya)
- Bazik fuksin (Tekkim, Türkiye)
- Gliserin (%99.5, Tekkim, Türkiye)
- Asetik Fenil (Tekkim, Türkiye)
- Bakır II sülfat (Tekkim, Türkiye)
- Silika jel 60 (Merck, Almanya)
- Entellan (Tekkim, Türkiye)

3.3 Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

- Coca Çözeltilisi
- Bovine Serum Albumin (BSA, Serva, Almanya)
- Bişinkonik Asit (BCA, Serva, Almanya)

3.4 Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

- Eppendorf tüp (ISO Lab, Almanya)
- Falkon Tüp (ISO Lab, Almanya)
- Lam- Lamel (ISO LAB, Almanya)
- Parafilm
- Kurutma Kağıdı
- Enjektör (ISO Lab, Almanya)
- Enjektör Filtresi (ISO Lab, Almanya)
- 96 Kuyucuklu Plate (SPL, Lide Sciences, Kore)

3.5 Polenlerin Toplanması ve Çalışmaya Uygun Hale Getirme

Polen örnekleri Gaziantep Üniversitesi, Merkez kampüs alanı içerisinde bulunan ve peyzaj amaçlı kullanılan *Morus alba* L., *Quercus robur* L., *Paulownia tomentosa* L. türü ağaçlardan 2017 yılında, disseminasyon dönemlerinde steril eldivenlerle kağıt zarflara toplanmıştır. Polenlerin erkek çiçek kurullarından dökülmesi için, erkek çiçek kurulları 1 gün boyunca kurutma kağıdının üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra polenler içerisinde bulunan nemin giderilmesi için içerisinde Silka jel bulunan desikatörde 24 saat bekletilmiştir. Bu işlem sırasında desikatörün hava alması engellenmiştir. Nemi alınan polenler farklı gözeneklere sahip eleklerden geçirilerek en alttaki toplama kabında biriktirilmiştir. Toplama kabında biriken polenler dijital hassas terazide ağırlıkları belirlendikten sonra protein ekstraksiyonu için muhafaza edilmiştir. Hassas terazide tartılan polenlere aseton ilave edilip çalkalanmış, yabancı maddeler yüzdürülerek polenlerden ayrılması sağlanmıştır. Ependorflara bölünen polen-aseton karışımları +4 °C'de 11000 rpm'de 1 saat santrifüj edilmiştir. Bu örneklerin süpernatant kısımları alınarak +4 °C'ye konulmuştur [65].

Polenlerin dağılmasını sağlamak için steril bir iğne ile karıştırılarak homojen bir yayılım göstermeleri sağlanmıştır, lamel ile kapatılan örnekler entellan kullanılarak daimi preparat haline getirilmiştir. Bu yöntem ile hazırlanan preparatlar, polenlerin intini ve protoplazmasının görülebilmesi açısından oldukça kullanışlı olmuştur [65].

3.6 Gliserinli Jelatin Hazırlama

Polenlerin morfoloji incelenmesi ve daimi preparat hazırlama yöntemlerinde kullanılan jelatin kapama yöntemi için 7 gr jelatin 42 ml distile su içerisinde bırakılarak şişmesi sağlanmıştır. Daha sonra üzerine 50 ml gliserin koyduktan sonra sıcak su banyosunda homojen hale gelmesi için 15 dk bekletilmiştir, bakteri ve mantarlardan korumak için 1 gr fenol, safranin ya da %2-3 oranında asetik fenil ilave edilmiştir. Bu karışım 80 °C'ye kadar ısıtılmış, boya maddesi olarak 1-2 ml bazik fuksin eklenmiştir, steril petrilere eşit miktarda dökülerek soğumaya bırakılmıştır [66].

3.7 Polen Morfolojisinin İncelenmesi

Polen morfolojilerinin mikroskop altında incelenmesi için Wodehouse yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem doğrultusunda; daha önceden hazırlanan polen örnekleri temiz bir lam üzerine alınarak polenlerin içerisindeki reçine ve yağları eritmek için %96'lık alkol damlatılmıştır ve alkolün uçmasının sağlanması için ısıtıcı üzerinde lamlar bekletilmiştir. Bazik fuksin eklenmiş gliserin jelatininden bir miktar alınarak polenlerin üzerine konulmuştur ve erimesi sağlanmıştır [104].

3.7.1 Polen Ölçümleri

Polen morfolojisinin incelenmesi için invert mikroskop kullanılmıştır, daha önce hazırlanan daimi preparatlar ile görüntülenme işlemi yapılmıştır. Polenlerin ekzin, intin kalınlıkları ölçülerek kaydedilmiştir. Böylece polen morfolojisi incelemeleri yapılarak daha sonra değerlendirilmek üzere kaydedilmiştir [105].

3.8 Polen Ekstrelerinin Hazırlanması

3.8.1 Polen Ekstrelerinin Hazırlanmasında İzlenen Yol

1. Alerjen polenlerin olgunlaşmalarından az önce toplanıp, kurutulmuştur
2. Temizlenmesi: bu amaçla polen büyüklüğüne göre gerekli eleklerden geçirilmiştir
3. Saflık, temizlik kontrolünün belirli örnek alma yöntemleriyle mikroskop altında yapılmıştır
4. Özel ekstraktör içerisinde ekstrakte edilerek kaba filtrasyon santrifügasyonlardan geçirilmiştir
5. İnce filtrasyon: 0.80 ve 0,45 mikron porlu filtrelerle
6. Kuru tartı: mg/ml değerinin saptanması amacıyla
7. Çözelti: elde edilen ekstrenin özel seyreltici ile istenilen konsantrasyonlara indirgenmesi
8. Steril izolasyon: laminer kabinde, U.V. altında, porları 0,22 mikron olan filtrelerle yapılmıştır [65].

3.8.2 Ekstraksiyon İçin Gereken Maddeler

3.8.2.1 Coca özeltisi ve Hazırlanması

Polen içeriğinde bulunan maddelerin ekstrakt olarak çıkabilmesi için ekstraksiyon materyali olarak ‘‘coca’’ çözeltisi kullanıldı. ‘‘Coca’’ özeltisi Pasteur Enstitüsünde uygulanan yöntemle göre, aşağıda gösterildiği gibi hazırlandı [68]. Bu kapsamda 9 gr NaCl, 3 gr NaHCO₃, 5 gr C₆H₅OH ve Distile su konularak toplam 1000 ml’ye tamamlanacak şekilde hazırlanmıştır [68].

3.8.2.2 Polen Ekstraksiyonu

Bu çalışmada polenlerin saflık derecesi saptandıktan sonra içerdikleri etken maddelerin ekstre edilebilmesi için Aytuğ vd.[67] tarafından uygulanmış olan ekstraksiyon yöntemleri kullanılmıştır. Her polenden 500 mg tartılmıştır ve 4.5 ml coca çözeltisi ilave edildi. Karışım +4 °C de manyetik karıştırıcı ile 24 saat karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda karışım 2750 devir/dakika olmak üzere 10’ar dakika süreyle santrifüj edilerek polenler ökeltiştir. Üstte kalan sıvı tekrar santrifüj edilmek üzere ayrılmıştır. Bu uygulama sıvıdan çökelen polen kalmayınca kadar 8 ile 10 kez tekrarlanmıştır. İçinde polen artığı kalmamasına rağmen çözeltinin diğere tortulardan da arındırılabilmesi için süzme (filtrasyon) yöntemi uygulanmıştır [65].

3.8.2.3 Filtrasyon İşlemleri

Ekstraksiyon sonucunda elde edilen özelti, Aytuğ ve diğ. (1991) [67] uyguladığı süzme işleminden geçirilmiştir. Bunun için santrifüj sonucunda elde kalan ekstraktın üzerine ‘‘coca’’ çözeltisi eklenerek 5 ml ye tamamlandı ve ‘‘coca’’ çözeltisi ile ıslatılmış kaba filtre kağıdından süzöldü. Ardından laminer kabinde; toz, mikroorganizma ve bakterilerden arındırılmış U.V. ışını ile steril edilmiş bir ortamda steril izolasyon tekniği uygulanmıştır. Bu uygulamada steril enjektör kullanılmış, sırası ile 0,45 µm por çaplı membran filtrelerden süzöler, steril filtrasyon işlemi sona erdirildi. Daha sonra ekstreler gliserin ile % 50 oranında karıştırılarak flakonlara konulmuş ve steril şartlarda ağızları kapatılmıştır. Böylece % 50 gliserin eklenen ekstreler buzdolabında +4 °C de 3 yıl saklama koşullarına erişmiş olmuştur [65].

3.8.2.4 Polenlerin Kuru Ağırlığının Saptanması

Kuru ağırlığın saptanmasında kullanılmak üzere iki dara kabı alındı ve ağırlıkları belirlendi. Bunun için desikatör içerisinde konulan dara kapları 110 °C'lik etüvde 2 saat bırakıldıktan sonra soğutuldu ve tartıldı. Polen örneğinden 10 mg tartıldı ve üzerine 3 ml saf su ilave edildi. Bu karışımdan 1'er ml alındı ve dara kaplarına konuldu. 110 °C'ye ayarlanmış bir etüvde suyu buharlaştırıldı. Buharlaşmanın kolaylaşması için etüve nem çekici olarak bakır sülfat (CuSO₄) konuldu. Bu işlemin sonunda cam kaplar soğutuldu ve tartıldı. Elde edilen ağırlıktan daranın ağırlığı çıkarılarak, materyalin kuru ağırlığı hesaplandı. Kuru madde miktarının hesabı polen ekstralarının standardizasyonu için yapılmaktadır [68].

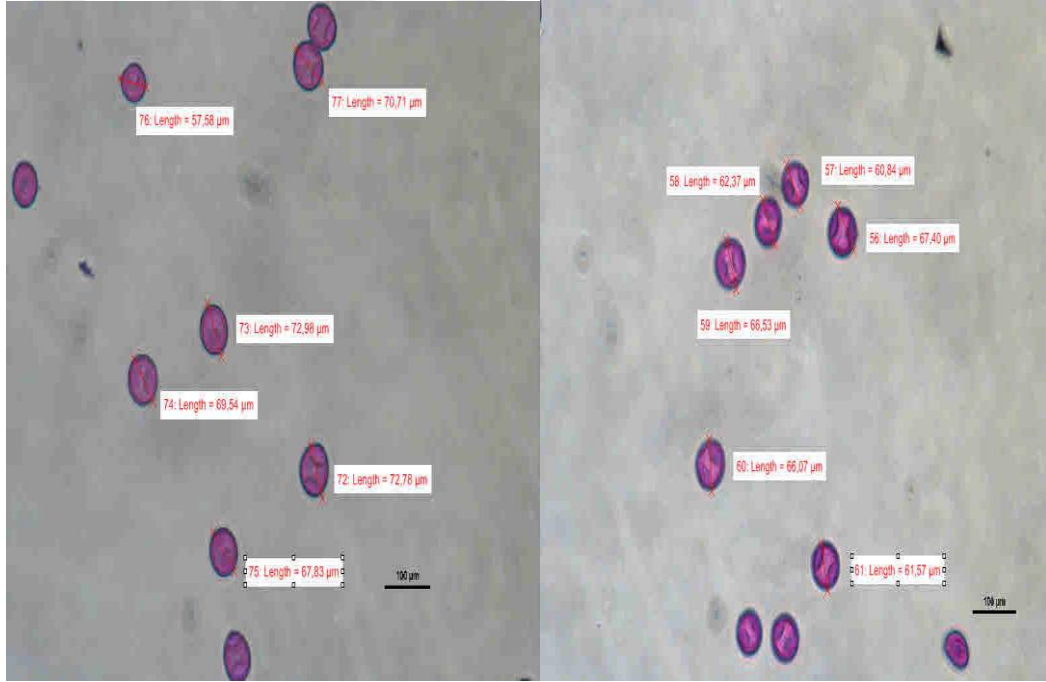
3.8.2.5 Polen Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Polenlerdeki protein konsantrasyonunu saptamak için bişinkonik asit yöntemine (Walker, 2002) göre çalışan BCA Protein Assay Kit kullanıldı. Protein örnekleri saf su içerisinde 5:1 (ağırlık:hacim) oranında çözündürüldükten sonra 96 kuyucuklu kaplara 3 tekrarlı ve her bir kuyucukta 25 µL olacak şekilde eklendi. Üzerine 200 µL, kit içeriğindeki A reaktifi ile B reaktifinin 50:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanan BCA belirteci eklenerek 37°C'de 30 dk bekletildi, ardından 562 nm'de kör örneğe (saf su) karşı absorban ölçümü alındı (Thermo Scientific Multiskan Go). Standart grafiğinin oluşturulmasında ise kit içerisindeki sığır serum albumini ("Bovine Serum Albumin", BSA) standartı ve kör örnek olarak saf su kullanıldı. Standart grafiği oluşturuldu. Elde edilen veriler standart grafiğe göre hesaplanmıştır [93].

BÖLÜM 4 BULGULAR

4.1 Polen Morfolojileri ve Ölçümler

Polen morfolojilerinin incelenmesi ve polen ölçümleri invert mikroskop altında gerçekleştirildi. İncelemeler dijital ortama kaydedilmiştir. Ölçümlerde intin ve ekzin ölçümleri yapılarak her bitkiye ait ortalama polen büyüklükleri ve ekzin kalınlıkları saptanmıştır (Tablo 4.1).



Şekil 4.1 *Morus alba* L. Polen Ekzin Ölçümleri X40

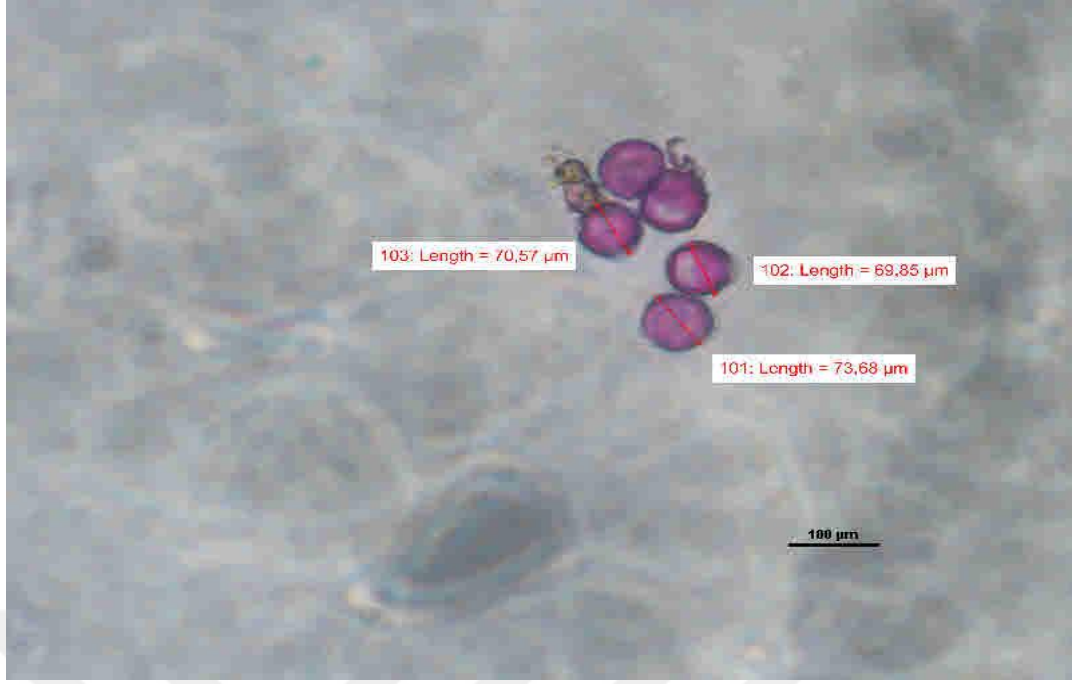
Tablo 4.1 Polen Ölçüm Sonuçları

TÜR	POLEN ŞEKLİ	POLEN BÜYÜKLÜĞÜ (ORT.) (μm)	EKZİN KALINLIĞI (ORT.) (μm)
<i>Morus alba</i> L.	prolate-sferoidal,	63,10	5,05
<i>Paulownia tomentosa</i>	oblate-sferoidal	75,33	7,70
<i>Quercus robur</i> L	prolate-sferoidal	27,94	4,53

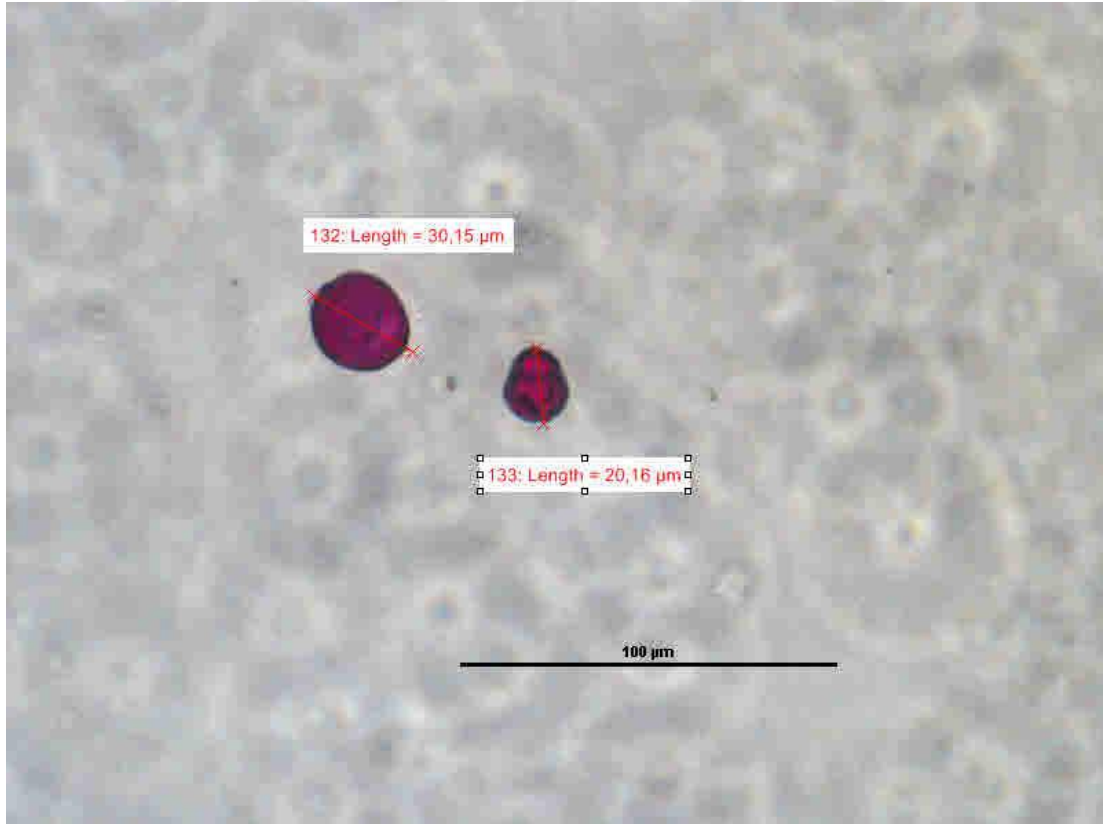
Polenin uzun eksenine polar eksen (P), kısa eksenine ise ekvatorial eksen (E) denir. Polar eksen uzunluğunun ekvatorial eksen uzunluğuna bölümünden (P/E) elde edilen rakama göre polenin şekli belirlenir. $P/E > 2.00$ ise polen şekli perprolate, $P/E: 2.00-1.34$ subprolate, $P/E: 1.14-1.01$ prolate-sferoidal, $P/E: 1$ sferoidal, $P/E: 0.99-0.89$ oblatesferoidal, $P/E: 0.88-0.76$ suboblate, $P/E: 0.75-0.50$ oblate, $P/E < 0.5$ peroblate olarak adlandırılır [98].



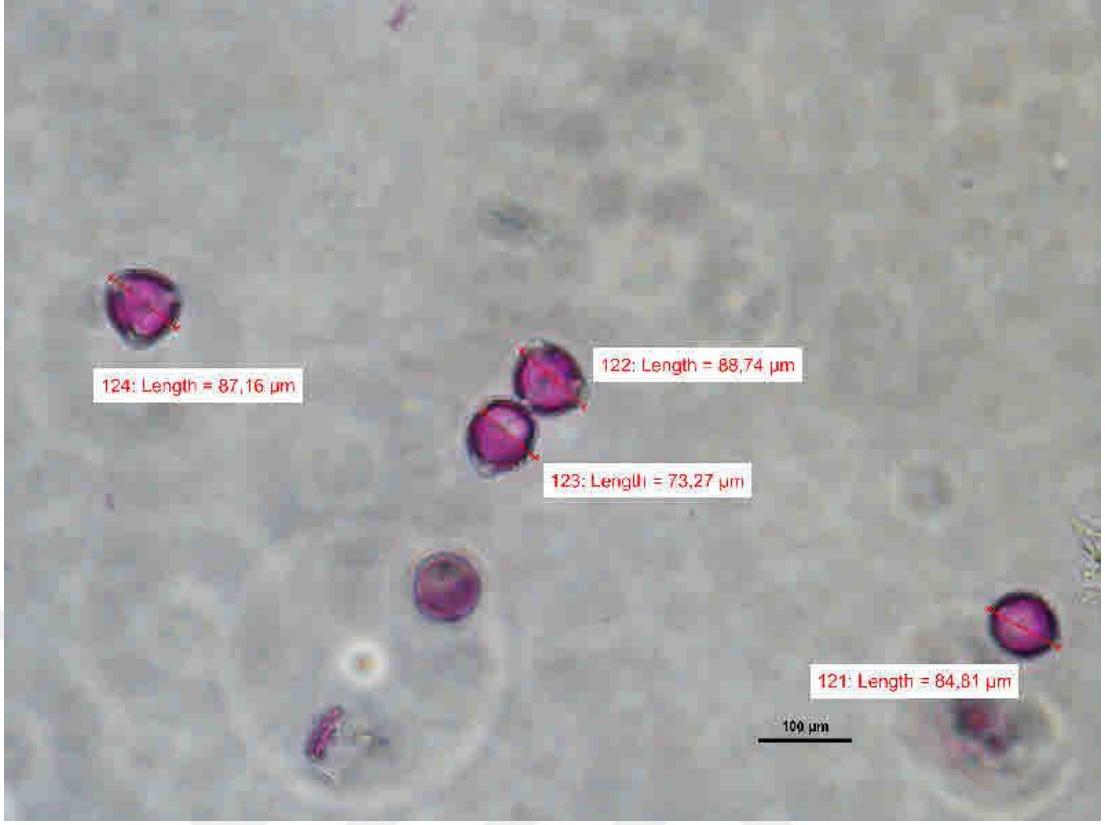
Şekil 4.3 *Paulownia tomentosa* L. Polen Ekzin Ölçümleri X40



Şekil 4.4 *Paulownia tomentosa* L. Polen Ekzin Ölçümleri X40



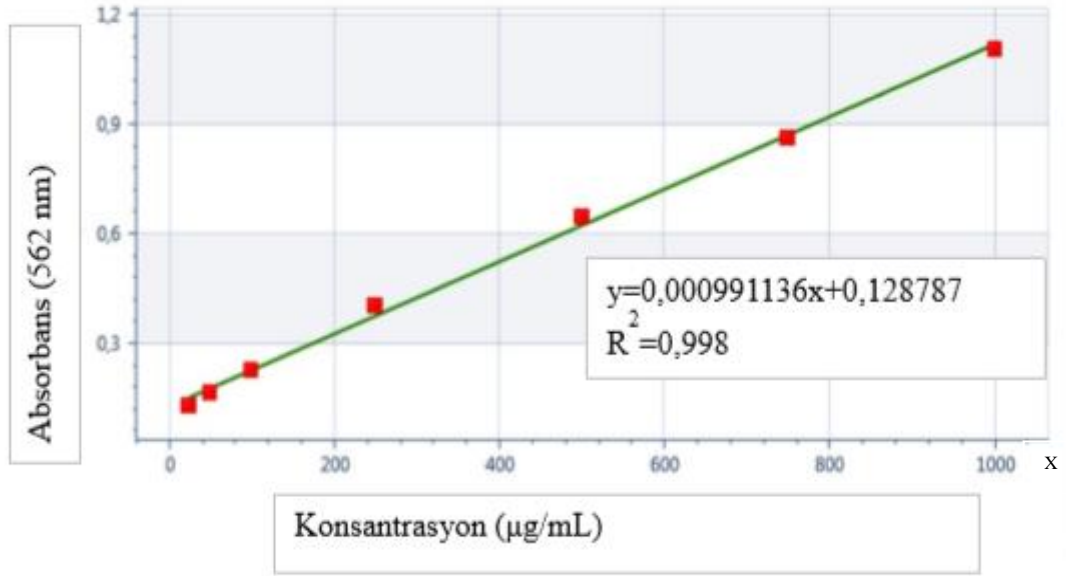
Şekil 4.5 *Quercus robur* L. Polen Ekzin Ölçümleri X40



Şekil 4.6 *Quercus robur* L. Polen Ekzin Ölçümleri X40

4.2 Protein Konsantrasyonları

Polen ekstralarının protein konsantrasyonları, sığır serum albümin (BSA) standartları (0.0313, 0.0625, 0.125, 0.250, 0.5, 1 mg/mL) ile çizilen standart grafik yardımı ile saptanmıştır. Oluşturulan standart grafiğın matematiksel ifadesi, lineer regresyon doğrusunun denklemi şeklindedir. Polen ekstralarının protein konsantrasyonu bu grafik için elde edilen doğru denklemi yardımıyla hesaplanmıştır (Şekil 4.7).



(R²= 0.998). Sığır serum albümin (BSA) standartlarının (0.0313, 0.0625, 0.125, 0.250, 0.5, 1mg/mL) 562 nm absorbans değerleri kullanılarak çizilmiştir.

Şekil 4.7 Protein konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan standart grafik

Çalışmalar sırasında kullanılan polen ekstralarının protein konsantrasyonları, polen örnekleri saf su içerisinde 5:1 (ağırlık: hacim) oranında çözündürüldükten sonra *Morus alba L.* poleni için 0,0234 µg/mL, *Paulownia tomentosa L.* poleni için 0,0625 µg/mL, *Quercus robur L.* poleni için ise 0.0130 µg/mL olarak ölçülmüştür. Elde ettiğimiz sonuçlara göre çalışılan üç bitki polenleri içerisinde saf ölçümler ile kıyaslandığında *Paulownia tomentosa L.* polen protein konsantrasyonu en yüksek bitkidir.

Allergopharma markalı ticari polen ekstraktları Asistan Med. San. Tic. Ltd. Şti.'den temin edilmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılmıştır ve elde edilen polen ekstraktlarının protein konsantrasyonları ölçülerek karşılaştırılmıştır. *Morus alba L* için 1376,992663 µg/mL, *Paulownia tomentosa L.* için 1640,326857 µg/mL,, *Quercus robur L* için 1418,695652 µg/mL olarak ölçülmüştür. *Paulownia tomentosa L* bitkisinin ticari kiti bulunmamaktadır.

Tablo 4.2 Polen Konsantrasyon Ölçüm Sonuçları

Tür	Ortalama Absorbans Değeri	Standart sapma	Protein konsantrasyonu
<i>Quercus robur L.</i> Ticari	0.873	0.030923	1010.40994
<i>Quercus robur L.</i> Saf	1.277	0.038378	1418.695652
<i>Morus alba L.</i> Ticari	0.653	0.018373	788.44242
<i>Morus alba L.</i> Saf	1.236	0.019026	1376.992663
<i>Paulownia tomentosa L.</i> Saf	1.497	0.120269	1640.326857

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Polenler taşımış oldukları proteinler veya glikoproteinler nedeniyle alerjik etki göstermektedir, suda çözünebilen proteinler ayrıca sıklıkla glikoprotein yapıdadır ve polenin dişi organına ulaşarak gerekli sıcaklık ve neme ulaşmasıyla meydana gelen uyum reaksiyonları sonucu, polen tüpünün oluşumu, büyümesi ve gelişmesinde önemli bir role sahip olan proteinlerdir [70, 71]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, aeroalerjenlerin sebep olduğu alerjik hastalıklara sahip bireylerin sayısında önemli bir artış olduğu gösterilmiştir [69].

Polinizasyon döneminde polenler en sık rüzgar ve böceklerle taşınmaktadırlar. Böceklerle tozlaşma sağlayan bitkiler genellikle az miktarda ve yüzeyleri girinti çıkıntılı ayrıca yapışkan polenler üretirken; rüzgarla tozlaşma sağlayan bitkiler, çok miktarda, kuru, hafif, küçük, yüzeyleri düz olan polenler üretmektedirler. Bunun amacı rüzgar ile uzak mesafelere taşınabilirliği sağlayıp döllenme olasılığını arttırmaktır [71].

Bu polenlerin bir kısmı dişi organa ulaşır tozlaşma sağlarken, takip eden döllenme ve tohum oluşumu ile bitkinin devamı sağlanır. Dişi organa ulaşamayan havada asılı kalan polenler ise alerjenik proteinler olarak, solunum sistemimizin burundan başlayarak akciğer bronşlarına ulaşabilmekte; böylelikle de duyarlı bireylerde alerjik rinokonjunktivit ve alerjik astım bronşiyel gibi solunum yolu hastalıklarına neden olabilmektedirler [71].

Polen alerjisi tanısının ilk basamağında, yaşanan bölgede maruz kalınan polenlerin tespit edilmesi gerekmektedir. Polenlerin yapıları, havadaki miktarları, ve alerjenitelerinin histokimyasal özellikleri buldukları coğrafik bölgeye, iklime ve çevre koşullarına göre değişebilmesi mümkün olduğundan [69]. Alerji tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde, klinik testlerle ve moleküler analizlerle hastaların yaşadığı bölgede saptanan polenler ile çalışmak gerekmektedir. Saflaştırılmış doğal alerjenlere karşı yaygın olarak kullanılan argümanlar, preparasyonların arasında saflık farkının olabileceğidir. Çok az miktarda kontaminant alerjen, yanıltıcı pozitif sonuçlar verebilir ve spesifik Ig E konsantrasyonlarının hatalı bulunmasına sebep olabilir.

Rekombinant veya saflaştırılmış doğal alerjenler, alerji tedavisi için kullanılan özelleştirilmiş immunoterapi için uygun polen aşısı seçimi için gerekli olan sensitizasyon (duyarlanma) paternlerinin çalışılmasında önemlidirler. Rekombinant alerjenlerin bir çoğu, spesifik Ig E' nin in vitro analizlerinde mükemmel denilecek kadar iyi bir performans gösterirler, saflaştırılmış doğal alerjenler iyi bir alternatif olabilirler. Bazı durumlarda doğal alerjenler, onların rekombinant kopyalarından çok daha iyi performans bile gösterebilirler. Doğal alerjenlerin avantajı ise bakteri içinde üretilen rekombinant alerjenlerden daha yüksek immunoreaktivite göstermeleridir. Sebebi, bakteriyel ekspresyon sisteminde rekombinantların uygun katlanmasının başarılmasının zor olabilmesidir [72].

Rekombinant DNA teknolojileri yolu ile hazırlanan bu rekombinant alerjenlerin maliyeti oldukça yüksektir. Alerjenlerin yüksek saflıkla elde edilebildikleri polen ekstraktlarında alerji tanı testleri ve alerjen immunoterapilerde kullanımının önünde bir engel görülmemektedir. Ayrıca polen ekstraktları alerjenlerin daha fazla izoformlarını içeriyor olmaları sebebi ile daha ön planda tutulabilir. Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz polen ekstraktlarını ticari olanlar ile kıyaslayarak uygunluk, farklılık, üstünlük, benzerlik olarak kıyaslama fırsatı bulduk. Amacımız doğrultusunda ithal edilen kitler ile kendi üretimimiz olan polen solüsyonlarını kıyaslayarak uygun fiyatlı ve yerli bir tanı testi amacı ile polen ekstraktları hazırlayabilmektir. Bununla birlikte hazırlanan solüsyonlar ile spesifik duyarlanmalara ek olarak ilgisiz alerjen duyarlanmaları oluşturmamak için sağlanması gerekli tek şey 'yüksek saflık' sorunudur.

Bu noktadan hareketle bu tez çalışmasında, Ak Dut (*Morus alba* L.), Saplı Meşe (*Quercus robur* L.) ve Prens Ağacı (*Paulownia tomentosa* L.) polenlerinin alerjenitesi ve alerjenik proteinleri araştırılmıştır.

Quercus sp., Fagaceae ailesindeki en geniş cinstir (Dufour D ve diğ..2004) Meşe (*Quercus spp.*) polen alerjisi Avrupa ve Kuzey Amerika' nın bazı bölgelerinde büyük bir sorundur. İspanya' da, Madrid' te, polen alerji hastalarının %14' ü (*Quercus spp.*) Meşe polenine karşı duyarlılık kazanmıştır. İsveç' te ise bu rakam polen alerjik bireylerde bahar aylarında %70-80' lere çıkabilmektedir. Que a 1, önemli bir Meşe (*Quercus spp.*) polen alerjenidir ve PR-10 protein ailesine aittir. İlgili ağaç polenlerinden (Bet v 1, Aln g 1, Cor a 1, Car b 1), meyvelerden (Mal d 1, Pru av 1, Pyr c 1), ve sebzelerden (Api g 1, Dau c 1) elde edilen diğer PR-10 alerjenleri gibi benzer Ig E bağlanması sebebi ile Bet v 1 ile yüksek oranda çapraz reaktivite göstermektedir. Pek çok PR-10 alerjeni rekombinant alerjenler olarak klonlanmış, gen dizilimi çözümlenmiş ve kodlanmış olmasına rağmen, Que a 1' in biyokimyasal ve immünolojik özelliklerine ait veriler sınırlıdır. Ipsen ve Hansen [72] ,polen ekstraktından Que a 1' i saflaştırmışlar ve ayrılmış alanlarla birlikte 24 rezidü uzunluğundaki N terminal aminoasit dizilimini açıklamışlardır [72]. Daha sonra yapılan çalışmalarda (2008) meşe polen ekstraktlarından native (n) Que a 1' i, Bet v 1' e karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar yardımı ile afinite kromatografisi kullanarak saflaştırmışlar, immünolojik ve biyokimyasal olarak özelliklerini belirlemişlerdir. Meşe polen alerjisinin tanısı, farklı bitkilerin desiminasyon dönemleri ile eş zamanlı olması nedeniyle zor olabilir ve hasta organların polen ekstraktları ile provokasyonu genellikle yapılmaz. Bu tanıyı zorlaştıran bir durumdur [91].

Literatür taramalarında *Morus alba* ve *Paulownia tomentosa* bitkilerine dair ölçümlerimiz sonucu protein konsantrasyonunun yoğunluğu, desiminasyon döneminin birçok farklı tür bitki ile aynı döneme geldiği ve alerjenlerin çapraz reaksiyon gösterebildiği göz önünde bulundurulunca bu türe ait bitkilerin alerjen proteinlerinin saptanması ve araştırılması da gerekmektedir. Özellikle *Paulownia tomentosa* bitkisi hızlı büyüme göstermesi özelliği açısından çevre ve peyzaj düzenlemede sıklıkla tercih edilen bitkiler arasındadır. Bu bitki çok fazla polen üretmesi, sıklıkla tercih edilmesi, polen yoğunluğu, protein konsantrasyonunun yüksek olması, polenlerin uzun süre atmosferde serbest halde kalması dolayısı ile alerjen oluşturma riski artmaktadır. Peyzaj düzenlemede bu tür fazla polen yayan bitkilerin kullanılmasına dikkat edilmesi çok sık olduğu bölgelerin gerekirse yeniden düzenlenmesi toplum sağlığı, yaşam kalitesini yükseltme, ilaç kullanımını azaltma, toplumsal olarak sağlık standartlarını daha makul seviyelere getirebilmek için önemli bir yere sahiptir.

Polen alerjilerinin tespiti için, bugün kullandığımız basit polen ekstraktları yerine, rekombinant alerjen aşularının kullanılacağı spesifik immunoterapi tedavileri geliştirilmektedir. Daha etkili ve özelleştirilmiş olan immünoterapise tedaviler ile ilgisiz alerjenlere karşı oluşabilecek yeni alerjilerin önüne geçilmek hedeflenmektedir [91]. Amacımız alerji tanı testlerinde kullanılan deri prick, nazal provakasyon testleri gibi kullanılan ticari formlarla fark ve benzerliklerini tespit ederek hazırlanan çözeltilerin yerli üretimine geçilebilmesi ve yerli alerjen kiti üretimi bakımından eksiklerinin giderilmesi için ilk adımları atmaktır.

Türkiye’de alerjik hastalıkların tansı ve tedavisi amacıyla kullanılan materyallerin Türkiye kökenli olmasını savunmaktayız. Çünkü bitkinin yetiştiği iklim, doğal koşullar, sıcaklık, nem gibi birçok farklı sebepten protein içerikleri ve yapıları değişebilmektedir. Bu anlamda hazırlamış olduğumuz ekstraktların daha sonra majör ve minör alerjen karakterizasyonu tespiti yapılarak yerli üretim için temel materyal olarak kullanılabilir niteliktedir [25].

KAYNAKLAR

- [1] Gruehn, S., Suphioglu, C., O’Heir, R.E. and Volkmann, D., (2003). Molecular cloning and characterization of Hazel Pollen protein (70 kD) as a luminal binding protein (BiP): a novel cross-reactive plant allergen, *International archives of allergy and immunology*, **131**, 91–100.
- [2] Behrent, H., Becker, WM., (2001). Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors, *Current Opinion in Immunology*, **13(6)**, 709-715.
- [3] Moverare R, Everberg H, Carlsson R, Holtz A, Thunberg R, Olsson P, Brostedt P, Hogbom E.(1995) Purification and characterization of the major oak pollen allergen Que a 1 for component-resolved diagnostics using ImmunoCAP®. *Int Arch Allergy Immunol.* **146**:203-211.
- [4] Oettgen, H.C., Geha, R.S., (1999). IgE in asthma and atopy: cellular and molecular connections, *Journal of Clinical Investigation*, **104**, 829-835.
- [5] Reid, E.C., Gamble, J.L., (2009). Aeroallergens, Allergic Disease, and Climate Change: Impacts and Adaptation, *Ecohealth*, **6(3)**, 458–470.
- [6] D’Amato, G., Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesi-Maesano, I., Behrendt, H., Liccardi, G., Popov, T., van Cauwenberge, P., (2007), Allergenic pollen and pollen allergy in Europe, *Allergy*, **62(9)**, 976-990.
- [7] Ferreira, F., Hawranek, T., Gruber, P., Wopfner, N., Mari, A., (2004). Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic, *Allergy.*, **59(3)**, 243-267.
- [8] Chapman, M.D., Pomés, A., Breiteneder, H., Ferreira, F., (2007). Nomenclature and structural biology of allergens, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **119(2)**, 414-420

- [9] Puc, M., (2003). Characterisation of pollen allergens, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **10(2)**, 143-149.
- [10] Sneller, M.R., Hayes, H.D., Pinna, J.L., (1993). Pollen changes during five decades of urbanization in Tucson, Arizona, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, **71(6)**, 519-524.
- [11] Sorkun, K., (1985). Balda Polen Analizi. *Teknik Arıcılık Dergisi*, **1**: 28-30.
- [12] Navarro, A.M., Orta, J.C., Sánchez, M.C., Delgado, J., Barber, D., Lombardero, M., (1997), Primary sensitization to *Morus alba*, *Allergy*, **52(11)**, 1144-1145.
- [13] Gell, P.G.H., Coombs, R.R.A., (1968), *Clinical Aspects of Immunology*, Blackwell Scientific Publications, London .
- [14] Abbas, A.K., Lichtman, A.H., (2007). *Temel İmmünoloji*, İstanbul Medikal Yayıncılık, 1. Baskı, İstanbul, 975-6395-61-3.
- [15] Broide, D.H., (2011), Molecular and cellular mechanisms of allergic disease, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, , 65-72. **108 (2)**
- [16] Poole, J.A., Matangkasombut, P., Rosenwasser, L.J., (2005). Targeting the IgE molecule in allergic and asthmatic diseases: review of the IgE molecule and clinical efficacy, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **115(3)**, 376-385.
- [17] Williams, C.M., Galli, S.J., (2000). The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **105**, 847-859.
- [18] Turner, H., Kinet, J.P., (1999) Signaling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilon RI, *Nature*, **25**, 24-30.
- [19] Kalyoncu, A., et al. (1995), Survey of the allergic status of patients with bronchial asthma in Turkey: a multicenter study. *Allergy*, **50 (5)**, 451-455.
- [20] Wahn, U., et al. (1997) Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life. *Journal of allergy and clinical immunology*. **99(6)**, 763-769

- [21] Rosenstreich, D.L., et al. (1997). The role of cockroach allergy and exposure to cockroach allergen in causing morbidity among inner-city children with asthma. *N Engl J Med*, **336(19)**, 1356-63.
- [22] Üzel, A., et al., (2005) Evaluation of the relationship between cockroach sensitivity and house-dust-mite sensitivity in Turkish asthmatic patients. *Respiratory medicine*. **99(8)**, 1032-1037.
- [23] Platts-Mills, T., et al., (2001). Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *The Lancet*. **357(9258)**, 752-756.
- [24] Almqvist, C., et al., (2003). Heredity, pet ownership, and confounding control in a population-based birth cohort. *Journal of allergy and clinical immunology*, **111(4)**, 800-806.
- [25] Çelik, G., et al., (2002). Risk factors determining allergic airway diseases in Turkish subjects. *Journal of Asthma*, **39(5)**, 383-390
- [26] Martinez, F.D. (1995). Viral infections and the development of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. **151(5)**, 1644-1647.
- [27] Newson, R., et al. (1998), Acute asthma epidemics, weather and pollen in England, (1987-1994). *European Respiratory Journal*, **11(3)**, 694-701.
- [28] Busse, W.W., (1993) Role and contribution of viral respiratory infections to asthma. *Allergy*,. **48(s17)**,57-61.
- [29] Stein, R.T., et al. (1999). Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *The Lancet*. **354(9178)**, 541-545.
- [30] Shaheen, S., et al. (1996). Measles and atopy in Guinea-Bissau. *The Lancet*. **347(9018)**, 1792-1796.
- [31] Global Initiative for Asthma (GINA), Global strategy for asthma management and prevention (Update 2015).
- [32] Brígida, G.F.S., (2016). Fatores de risco para problemas respiratórios e musculoesqueléticos: o papel do tabagismo passivo e dor lombar.
- [33] Dezateux, C., et al.,(1999). Impaired airway function and wheezing in infancy: the influence of maternal smoking and a genetic predisposition to asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. **159(2)**, 403-410.

- [34] Guderman, W.J., et al.,(2004). The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. *New England Journal of Medicine*. **351(11)**, 1057-1067.
- [35] Bayram, H. and Ö. Dikensoy, *Tüberkloz ve Toraks Dergisi*, (2006). Hava kirliliği ve solunum sağlığına etkileri. **54(1)**.
- [36] Tomac, N., et al. (2005). Prevalence and risk factors for childhood asthma in Zonguldak, Turkey. in *Allergy and asthma proceedings.. OceanSide Publications, Inc*.
- [37] Demir, A.U., et al (2004). Asthma and allergic diseases in schoolchildren: third cross-sectional survey in the same primary school in Ankara, Turkey. *Pediatric allergy and immunology*. **15(6)**, 531-538.
- [38] Garcia-Larsen, V., et al. (2016). Asthma and dietary intake: an overview of systematic reviews. *Allergy*. **71(4)**, 433-44
- [39] Uslu C. (2003) Erzurum’da alerjik rinitli hastalarda prik testi sonuçları. *KBB Klinikleri*. **5**: 22-5.
- [40] Şahin F, Şahin A (2002): Alerjik rinitte tanı, 93.
- [41] Taylor G, Walker J. Charles Harrison Blackley (1973). 1820-1900. *Clin Allergy*. **3**:103–8.
- [42] James, T., (2002), Allergy testing, *American Family Physician*, 66, 4.
- [43] Williams, P., Sewell, W.A., Bunn, C., Pumphrey, R., Read, G., Jolles, S., (2008). Clinical immunology review series: an approach to the use of the immunology laboratory in the diagnosis of clinical allergy, *Clinical & Experimental Immunology*, **153(1)**, 10-18.York
- [44] Lim, M.Y., Leong, J.L., (2010), Allergic rhinitis: evidence-based practice, *Singapore Medical Journal*, **51(7)**, 542-550.
- [45] Dunagan DP, Georgitis JW. (2000). Intranasal Disease and Provocation Diagnostic Testing of Allergic Disease 151-170.
- [46] Hamilton, R.G.,Adkinson, F.N., (2004), In vitro assays for the diagnosis of IgE-mediated disorders, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **114(2)**, 213-225.

- [47] Elshal, M.F., McCoy, J.P., (2006) Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA, *Methods*, **38(4)**, 317-323.
- [48] Lucas, J.M., (2010), Microarrays: molecular allergology and nanotechnology for personalised medicine (I), *Allergologia et Immunopathologia (Madr)*, **38(3)**, 153-161.
- [49] Sastre, J., Lluch-Bernal, M., Bustillo, A.M., Carnes, J., Maranon, F., Casanovas, M. and Fernandez-Caldas, E. (2004). Allergenicity and cross-reactivity of Russian olive pollen (*Eleagnus angustifolia*), *Allergy*, **59**, 1181–1186.
- [50] Puc, M., (2003). Characterisation of pollen allergens, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **10(2)**, 143-149.
- [51] Sastre, J., (2010). Molecular diagnosis in allergy, *Clinical & Experimental Allergy*, **40(10)**, 1442-1460.
- [52] Huby, R.D., Dearman, R.C., Kimber, I., (2000), Why Are Some Proteins Allergens?, *Toxicological Sciences*, **55**, 235-246.
- [53] Herbert, C.A., King, C.M., Ring, P.C., Holgate, S.T., Stewart, G.A., Thompson, P.J., Robinson, C., (1995), Augmentation of permeability in the bronchial epithelium by the house dust mite allergen Der p 1, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **12**, 369-378.
- [54] Taketomi, E.A., Sopelete, M.C., de Sousa Moreira, P.F., de Assis Machado Vieira, F., (2006). Pollen allergic disease: pollens and its major allergens, *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, **72(4)**, 562-567.
- [55] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., (2008). *The Cell*, Garland Science, 270 Madison Avenue, New York NY 10016, USA.
- [56] Gençer, A., Şirin, G., Gül, H., Özgül, U. (2013). Determination of the Product Conditions of Pulp and Paper from White Mulberry (*Morus alba* L.) by Kraft Method. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, **15**, 1-2.
- [57] Rodríguez, R., Villalba, M., Batanero, E., Palomares, O., Salamanca, G., (2007). *Emerging pollen allergens*, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **61(1)**, 1-7.

- [58] González-Buitrago, J.M., Ferreira, L., Isidoro-García, M., Sanz, C., Lorente, F., Dávila, I., (2007), Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic diseases, *Clin Chim Acta*, **385(1-2)**, 21-7.
- [59] Fey, S.F., Larsen, P.M., (2001), 2D or not 2D, *Current Opinion in Chemical Biology*, **5**, 26-33.
- [60] Crobach M, Hermans J, Kaptein A, Ridderikhoff J, Mulder J. (1996). Nasal smear eosinophilia for the diagnosis of allergic rhinitis and eosinophilic non-allergic rhinitis. *Scand J Prim Health Care*; **14(2)**:116-21.
- [61] Gendo K, Larson EB. (2004). Evidence-based diagnostic strategies for evaluating suspected allergic rhinitis. *Ann Intern Med*, **140**: 278.
- [62] Demoly P, Piette V, Bousquet J. (2003). In vivo methods for study of allergy. Skin tests, techniques, and interpretation. In: Adkinson SF, et al. *Middleton's Allergy Principles & Practice*. (6th ed) Philadelphia, Mosby 631-43.
- [63] Yaşar H, (2000). Sarıkahya İ. Alerjik rinitli hastalarda Prick test ile Multi-Test cilt testinin karşılaştırılması. *Türk Otolarengoloji Arşivi*; **38 (2)**: 87- 90.
- [64] Pıpkorn U. (1988). Pharmacological influence of antiallergic medication in vivo allergen testing. *Allergy* **43**: 81- 86.
- [65] (<https://www.anatomica.com.tr/alerji-testleri-nelerdir>)
Erişim tarihi: 19.03.2019 Lacovacci, P., Afferni, C., Barletta, B., Tinghino, R., Felice, G.D., Pini, C., Mari, A., 1998, Juniperus oxycedrus: A new allergenic pollen from the Cupressaceae family, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **101(6 Pt 1)**,755-761.
- [66] Sorkun, K., (1985). Balda Polen Analizi. *Teknik Arıcılık Dergisi*, **1**: 28-30.
- [67] Aytuğ, B., Dal, M., Çolakoğlu, B., Öner, A., Peremeci, E., Temiz, D., Güvener, B., Bayram N., Uyar M., Elbek O., Dikensoy Ö., Filiz A., (2013). Allergy Skin Test Results of an Outpatient Pulmonary Clinic in Gaziantep, *Gaziantep Medical Journal*, **19(3)** 152-154.
- [68] Aytuğ, B., (1996). "Polen Ekstrelerinin Hazırlanması" Yüksek Lisans Ders Notları.
- [69] D'Amato G. (2002). Environmental urban factors (air pollution and allergens) and the rising trends in allergic respiratory diseases. *Allergy*; **57:Suppl 72**, 30-3.

- [70] Çelenk S. (2011) Bazı polenler neden daha alerjik? Why some pollen grains are more allergenic? *Türkiye Klinikleri J Allergy-Special Topics* **4(1):5-9**
- [71] Bıçakçı A, Tosunoğlu A. (2016). The influence of environmental and atmospheric variables on allergenic pollen. *Asthma Allergy Immunology* **14:107116**.
- [72] Ipsen H, Hansen O. C. (1991). The NH₂-terminal amino acid sequence of the immunochemically partial identical major allergens of alder (*Alnus glutinosa*) Aln g 1, birch (*Betula verrucosa*) Bet v 1, hornbeam (*Carpinus betulus*) Car b 1 and oak (*Quercus alba*) Que a 1 pollens. *Mol Immunol.***28:1279-1288**.
- [73] Adkinson, N.F., Bochner, B.S., Burks, A.W., Busse, W.W., Holgate, S.T., Lemanske, R.F., O’Hehir, R.E., (2014) *Allergy Principles and Practice*, Elsevier Saunders, 1600John F. Kennedy Blvd., Ste. 1800, Philadelphia, USA, ISBN: 978-0-323-08593-9.
- [74] Araz Ç.N., (2009). *Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **11(3)** 21-27.
- [75] Büyükdevrim, S., Güven, K.C., (1991), “Türkiye Alerjik Polenlerinden Polen EkstresiCabi E. (2005) Trakya Bölgesindeki Gramineae Familyasına Ait, Bazı Türlerin Polen Morfolojisinin İncelenmesi ve Polen Ekstrelerinin Hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- [76] Çatakoğlu A.H. (2013) Atmosferdeki Polen Yüğü ile Alerji Polikliniğine Başvuru Sıklığı ve Hasta Şikayeti Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı, Denizli.
- [77] Dufour Dror J. M, Ertaş A.(2004) Bioclimatic perspectives in the distribution of *Quercus ithaburensis* Decne. subspecies in Turkey and in the Levant. *Journal of Biogeography.***31:461-474**.
- [78] Çelenk S. (2011) Bazı polenler neden daha alerjik? Why some pollen grains are more allergenic? *Türkiye Klinikleri J Allergy-Special Topics* **4(1):5-9**
- [79] Ishizaka, K., Ishizaka, T., (1967), Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity, *Journal of Immunology*, **99**, 1187-98.
- [80] D’Amato G, Spiekma MF, Bonini S. (1991). Allergenic pollen and pollinosis in Europe. *Blackwell Scientific Publications*.

- [81] ERDTMAN G. (1952). The Acetolysis Method. A revised description
Svensk. Bot. Tidskr. **54**: 61-56
- [82] Heiss, S., Fischer, S., Muller, W.D., Weber, B., Hirschwehr, R., Spitzauer, S., Kraft, D. and Valenta, R., (1996), Identification of a 60 kD cross-reactive allergen in pollen and plant derived food, *Journal of allergy and clinical immunology*, **98**, 938– 947.
- [83] D’Amato G. (2002). Environmental urban factors (air pollution and allergens) and the rising trends in allergic respiratory diseases. *Allergy*; **57**:Suppl **72**, 30-3.
- [84] FAEGRI K. and IVERSEN J. (1975). Textbook of Pollen Analysis Hafner Press. New
- [85] Pham, N.H. and Baldo, B.A., (1995). Allergenic relationship between taxonomically diverse pollens, *Clinical and experimental allergy*, **25**, 599–606.
- [86] Erkan P., Bıçakcı A., Aybeke M., (2010). Analysis of Airborne Pollen Fall in Tekirdag, Turkey, *Asthma Allergy Immunol*, **8**; 46-54.
- [87] Koçer F. (2015) (Doğu Kızılağacı) defne. Polenine Karşı Gösterilen IgE Reaktivite Profilinin Belirlenmesi ve Majör Alerjenlerinin Saflaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak.
- [88] O’Connell, E.J., (2004). The burden of atopy and asthma in children, *Allergy*, **78**, 7-11.
- [89] Schwietz, L.A., Goetz, D.W., Whisman, B.A. and Reid, M.J., (2000). Cross-reactivity among conifer pollens, *Annals of allergy, asthma and immunology*, **84**, 87–93.
- [90] Waldschmidt, T.J., Tygrett, L.T., (1992). The low-affinity IgE receptor (CD23) participates in B cell activation, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **323**, 149-156.
- [91] Moverare R, Everberg H, Carlsson R, Holtz A, Thunberg R, Olsson P, Brostedt P, Hogbom E.(1995) Purification and characterization of the major oak pollen allergen Que a 1 for component-resolved diagnostics using ImmunoCAP®. *Int Arch Allergy Immunol*. **146**:203-211.

- [92] Singh, B.P., Singh, A.B., Nair, P.K., Gangal, S.V., (1987). Survey of airborne pollen and fungal spores at Dehra Dun, India, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, **59(3)**, 229-234.
- [93] Walker, J.M., (2002). The Protein Protocols Handbook, Second edition, *Humana Pres.* Weber, R.W., (2003). Patterns of pollen cross allergenicity, *Journal of allergy and clinical immunology*, **112**, 229–239.
- [94] Mungan, D., et al (2003). Pet allergy: how important for Turkey where there is a low pet ownership rate. in *Allergy and asthma proceedings*. OceanSide Publications, Inc
- [95] Shaheen, S., et al. (1996). Measles and atopy in Guinea-Bissau. *The Lancet*. **347(9018)**: p. 1792-1796.
- [96] Wahn, U., et al. (1997) Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life. *Journal of allergy and clinical immunology*. **99(6)**: p. 763-769
- [97] Masoli, M., Fabian, D., Holt, S., Beasley R., (2004), The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report, *Allergy*, **59(5)**, 469-478.
- [98] Pınar M. (2003). *Palinoloji Laboratuvar Kılavuzu*, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Döner Sermaye İşletmesi Yayınları No:66, Ankara
- [99] Sastre, J., (2010). Molecular diagnosis in allergy, *Clinical & Experimental Allergy*, **40(10)**, 1442-1460.
- [100] Taş Ş. (2015) İstanbul'daki Akdeniz Servisi (*Cupressus sempervirens* L.) ve Sabin Ardıcı (*Juniperus sabina* L.) Polenlerinin Alerjenik Proteinleri. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [101] Lacovacci, P., Afferni, C. and Barletta, B., 1998, Juniperus oxycedrus: a new allergenic pollen from the Cupressaceae family, *Journal of allergy and clinical immunology*, **101**: 755–761.
- [102] Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G. T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Frobenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C., 1985, *Measurement of protein using bicinchoninic acid*, *Analytical biochemistry*, **19**,76-8
- [103] Yalıtık, F., Efe, A.1994. “*Dendroloji Ders Kitabı*”, İ. Ü. Orman Fak. Yayınları, İstanbul.

- [104] Wodehouse, R. P., "Pollen Grains", Mc Graw. Hill, N.Y. 314-332 (1935).
- [105] Ertzman, G., "The Acetolysis Method. A Revised Description", *Svensk. Bot. Tidskr.*, 54: 561-564 (1960).

